

Quantifizierung optischer Systeme für die optische Tomographie

Von der Fakultät für Mathematik und Physik
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Phys. Raoul-Amadeus Lorbeer

geboren am 01.02.1984 in Crailsheim

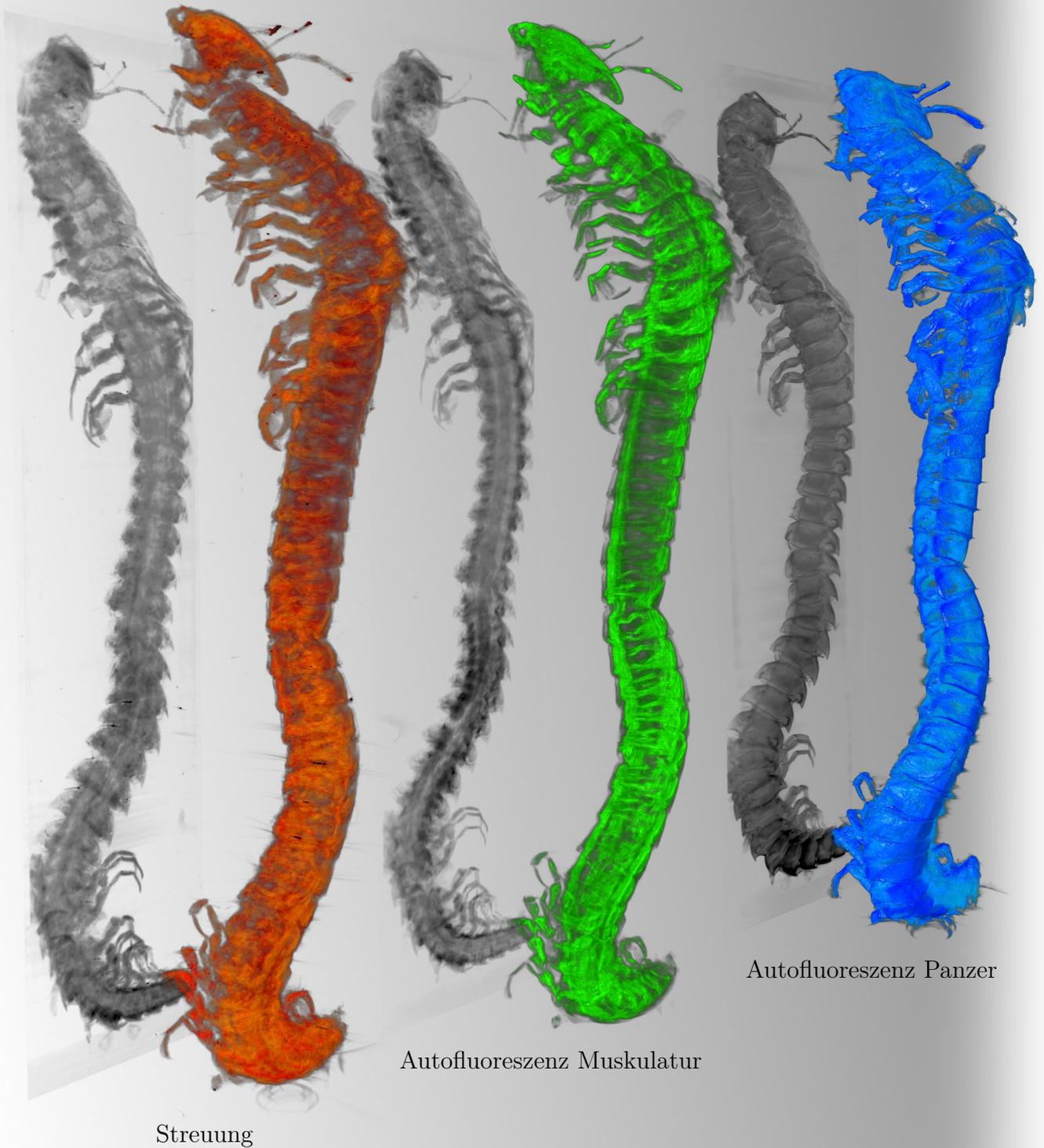
2012

Referent: Prof. Dr. Alexander Heisterkamp

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Morgner

Tag der Promotion: 11.06.2012

Godzillioognomus



“It is an old maxim of mine that when you have excluded the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.” (Arthur Conan Doyle, Kurzgeschichte: “The Adventure of the Beryl Coronet” aus “Adventures of Sherlock Holmes”, 1892, Seite 278) [Doy92]

Zusammenfassung

Die Lichtmikroskopie ist eines der wichtigsten Werkzeuge in den modernen Naturwissenschaften. In der Medizin, Biologie, Biochemie, Physik, Mineralogie, Kristallographie, Ingenieurwissenschaften und vielen weiteren Fachgebieten sind optische Mikroskope essenzielle Bestandteile der Forschungsmethoden. Es hat sich gezeigt, dass die bereits seit mindestens vier Jahrhunderten andauernde Entwicklung noch kein Ende absehen lässt. Im Laufe dieser Zeit wurden viele unterschiedliche Techniken entwickelt, die zusammengenommen nahezu alle Eigenschaften des Lichts nutzen.

Die meisten Mikroskopietechniken können in der Untergruppe der Fernfeldmikroskopie zusammengefasst werden. Dies ist von Vorteil, da die elektromagnetische Wellengleichung Fernfelder vollständig beschreiben kann. Diese Tatsache wurde in dieser Arbeit genutzt, um eine Möglichkeit zu schaffen, diese Mikroskopietechniken mit einer einheitlichen Methodik zu charakterisieren und im Computer zu simulieren.

Ausgehend von diesem Standpunkt wurde eine relativ junge Mikroskopietechnik, die optische Projektionstomographie (OPT), untersucht und weiterentwickelt. Die OPT kann als Röntgen-Computertomographie verstanden werden, bei der die Röntgenstrahlung durch Licht substituiert wurde. Sie ist in der Lage, Proben von mehreren Millimetern Größe aufzunehmen. Die gemessenen Daten entsprechen zunächst einer Ansammlung von Projektionen. Zur Generierung eines dreidimensionalen Datensatzes ist zuvor eine Rekonstruktion notwendig. Hierbei existieren mehrere Möglichkeiten, deren individuellen Eigenschaften mit der Rausch und Artefaktanfälligkeit des Systems direkt verwoben sind.

Somit existieren zwei Felder, von deren Entwicklung die optische Tomographie direkt profitiert. Sowohl in der Optik als auch der Rekonstruktion wurden in dieser Arbeit Fortschritte erzielt. Bei der Rekonstruktion der Daten konnte ein neues Verfahren eingeführt werden: die Sinogrammauswertung. Auf diese Weise können Streifenartefakte unterdrückt und Informationen über Rekonstruktionsqualität sowie die Richtungen „direkter“ Blickwinkel aus Rohdaten extrahiert werden. Am optischen System wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Auflösung möglich ist. Dem ist zwar so, allerdings musste festgestellt werden, dass die Empfindlichkeit des Systems hierdurch unannehmbar herabgesetzt wird. Als Alternative zu dieser Entwicklung wurde die generelle Erhöhung der Empfindlichkeit verfolgt. Mit dem hier auf Basis der OPT entwickelten scannenden laseroptischen Tomographen (SLOT) konnte die Systemempfindlichkeit um zwei Größenordnungen gesteigert werden.

Da keine Hinderungsgründe zur weiteren Steigerung der Aufnahmeempfindlichkeit bekannt sind, sollte diese technisch auf eine 90 %-ige Effizienz erhöht werden können. Dies ist damit die erste bekannte Technik mit solch einem Potential für mehrere Millimeter große Objekte.

Schlagnworte: optische Projektionstomographie, scannende laseroptische Tomographie, Punktspreizfunktion, numerische Wellenoptik, Rekonstruktion, Interpolation

Abstract

Light microscopy is one of the most important tools in modern science. In medicine, biology, biochemistry, physics, mineralogy, crystallography, engineering and many other fields optical microscopes are essential components for research methods. The ongoing development throughout the last four centuries does not appear to have reached an end yet. In the course of time many different techniques have been developed which together take advantage of almost all the properties of light.

The dominant part of all microscopy techniques can be summarized in the subgroup of far-field microscopy. This categorization is advantageous because it requires only the electromagnetic wave equation to describe the far fields entirely. Here this fact was utilized to create a possibility for all of these microscopy techniques, to be characterized with a consistent and complete methodology and to be simulated in a computer program.

On this basis, a relatively new three-dimensional microscopy technique, the optical projection tomography (OPT) has been studied and significantly improved. Optical projection tomography can be understood as X-ray computed tomography, while the X-rays are substituted by light. It is capable of measuring samples several millimeters in size. The measured data represents a set of projections. To generate three dimensional datasets a reconstruction is necessary. There exist several reconstruction methods whose properties are directly entangled with the final quality of the system.

Thus optical tomography profits directly from the improvement of each: the optics and the reconstruction. In this thesis progress has been achieved in both fields. Reconstructing the data, a new method - the sinogram-evaluation - was introduced. It has been shown that by this method streak artifacts can be suppressed and other information like the reconstruction quality or the directions of "direct" sight can be extracted from the raw data. It was investigated whether an increase in resolution is possible with the optical system. This, indeed, is possible. However, the sensitivity of the system is thereby reduced unacceptably. As an alternative to this development, the general increase in sensitivity was pursued. With the scanning laser optical tomograph (SLOT) developed here, the recording sensitivity could be increased by two orders of magnitude.

Since there is no known restriction for further increase of the recording sensitivity, technically an efficiency above 90 % should be reachable. This is the first identified technique with such a potential for several millimeter-sized objects.

Keywords: optical projection tomography, scanning laser optical tomography, point spread function, numerical wave optics, reconstruction, interpolation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Fluoreszenzmikroskopie	1
1.2. Röntgentomographie	4
1.3. Optische tomographische Verfahren	5
1.4. Biologische Organismen	5
2. Analyse und Beschreibung optischer Systeme	7
2.1. Elektromagnetische Wellengleichung	8
2.2. Quantenmechanische Einschränkungen	10
2.3. Wellenmechanische Abbildung	12
2.4. Bildentstehung	19
2.5. Parameterraum	25
3. Numerische Beschreibung der Fernfeldoptik	35
3.1. Fourierraum und FFT	36
3.2. Fokussimulation	39
3.3. Dimensionsreduktion	42
3.4. Interpolation	43
3.5. Simulationen und erhöhte Tiefenschärfe	51
3.6. Diskussion	57
4. Optische Projektionstomographie	59
4.1. Ursprünge	60
4.2. Optischer Projektionstomograph	62
4.3. Auflösungsoptimierung	65
4.4. Diskussion	71
5. Rekonstruktionsalgorithmen in der optischen Tomographie	73
5.1. Datensätze zur Beurteilung der Algorithmen	74
5.2. Inverse Radontransformation	74
5.3. Fourierschnittrekonstruktion (FSR)	77
5.4. Iterative Algorithmen	78
5.5. Sinogrammauswertung	80
5.6. Ausführungsdauer	86
5.7. Diskussion	87

6. Scannende laseroptischer Tomographie (SLOTy)	89
6.1. Der scannende laseroptische Tomograph (SLOT)	90
6.2. Vergleich von SLOTy mit OPT	91
6.3. Optisches Aufklaren	95
6.4. Kontrastmechanismen in der SLOTy und OPT	96
6.5. Diskussion	101
7. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	105
Quellen	109
Symbole und Abkürzungen	121
A. Nebenrechnungen zur inversen Radontransformation	127
B. Empfindlichkeit bei isotroper Emission	129
C. 1951 USAF Auflösungsstandard	131
D. ImageJ-Makro zur SNR-Bestimmung	133
E. Empfindlichkeit mit superpositioniertem Hintergrundsignal	135
Eingesetzte Software	137
Publikationsliste	139
Lebenslauf und Bildungsweg	143
Danksagung	145

1. Einleitung

Seit jeher ist das menschliche Auge das mächtigste Werkzeug der Naturwissenschaften. Der Großteil aller Versuche in Physik, Chemie und Biologie dient der Sichtbarmachung und Quantifizierung von Effekten. Die Beschreibung und Beobachtung erfolgt auch heute noch häufig „manuell“, wobei sich eine Weiterentwicklung abzeichnet. Wurden ursprünglich nur Beobachtungen mit bloßem Auge durchgeführt, fanden daraufhin optische Hilfsmittel wie Lupen, Mikroskope und Teleskope Verwendung. Mit der Entwicklung der Computertechnik und der damit verbundenen Halbleitertechnik geht heutzutage die Tendenz dahin, auch das Auge (zunächst) durch einen Sensor mit zugehörigem Computer zu ersetzen. Dennoch ändert dies nichts an dem grundlegenden Charakter einer optischen Messung, lediglich das Werkzeug ist ein anderes. An diese Entwicklung wird hier nun angeknüpft. Es geht um die Gestaltung optischer Instrumente - Mikroskope - bzw. Werkzeuge unter Zuhilfenahme des Computers, sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Umsetzung.

1.1. Fluoreszenzmikroskopie

Auf der Fluoreszenzmikroskopie basierende Verfahren dominieren die aktuelle Forschung und Entwicklung der Lichtmikroskopie. Die Ursprünge der Mikroskopie liegen im Einsatz von Lupen mit kurzen Brennweiten, die auch als „einfache Mikroskope“ bezeichnet werden [Har59]. Die Vergrößerung V_L kann bei Kenntnis des Sichtabstandes des Auges ohne Optik s_0 und der Brennweite der Linse f mit

$$V_L = \frac{s_0}{f} \quad (1.1)$$

berechnet werden [Dem99]. Kugellinsen, die meist durch das Schmelzen von Glas hergestellt wurden, erreichten hierdurch eine bis zu 2560 fache Vergrößerung [Har59]. Die Abbildungsqualität dieser Linsen ist allerdings bei weitem nicht ideal, was dazu führte, dass bereits im 17-ten und 18-ten Jahrhundert Dublett- oder auch Triplettoptiken entwickelt wurden. Praktisch parallel zu den sogenannten einfachen Mikroskopen entwickelten sich die zusammengesetzten Mikroskope, welche, neben Variationen in der exakten Ausführung, aus einem Objektiv und einem Okular bestehen. Das Objektiv, welches im Prinzip wieder eine Lupe mit der Brennweite f_1 darstellt, erzeugt ein virtuelles und vergrößertes Zwischenbild im Abstand b_1 . Dieses wird daraufhin mit einer weiteren Lupe der Brennweite f_2 , dem Okular, betrachtet. So kann die Vergrößerung V_M auf zwei Linsen verteilt werden. Dies erlaubt längere Brennweiten und damit die Nutzung einfacher Linsen. Mit d_M als Abstand zwischen den Hauptebenen der beiden Linsen und g als Abstand des Objektivs zu

der Objektebene folgt [Dem99]:

$$V_M = \frac{b_1 s_0}{g f_2} \approx \frac{(d_M - f_2) s_0}{f_1 f_2} \approx \frac{d_M s_0}{f_1 f_2} \quad (1.2)$$

Neben der Optimierung der optischen Systeme zur Minimierung von Abbildungsfehlern war bis zum Ende des 19-ten Jahrhunderts nicht bekannt, worin neben der Fertigungsgenauigkeit die genauen Gründe für die endgültige Auflösung liegen [Vol66]. Obwohl Beugungseffekte schon seit 1665 bekannt sind, Thomas Young 1803 bereits die Wellennatur des Lichtes postulierte und James Clerk Maxwell 1865 Lichtwellen mit elektromagnetischen Gleichungen beschreiben konnte [Gri65, You03, Max65], gelang es erst Ernst Abbe am Ende des 19-ten Jahrhunderts eine grundlegende Grenze für die Auflösung eines Mikroskops zu definieren [Abb80]:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.3)$$

Hierbei ist Δx der Abstand zwischen zwei Punkten, die bei der Wellenlänge λ und der durch das Objektiv gegebenen Numerischen Apertur (NA) noch voneinander getrennt werden können. Parallel entwickelten sich auch die Beleuchtungstechniken und der mechanische Aufbau der Mikroskope weiter, um die erzielten Verbesserungen sinnvoll nutzen zu können [Har59, Abb04].

Zum Anfang des 20-ten Jahrhunderts war die Erhöhung der numerischen Apertur (NA) durch Immersionsobjektive bereits weit ausgeschöpft worden, was August Köhler 1904 dazu veranlasste, als letzten verbleibenden Freiheitsgrad in Abbes Gleichung die Wellenlänge zur Steigerung der Auflösung zu verkürzen. Hierfür nutzte er verschiedene UV-Lichtquellen und -Optiken.

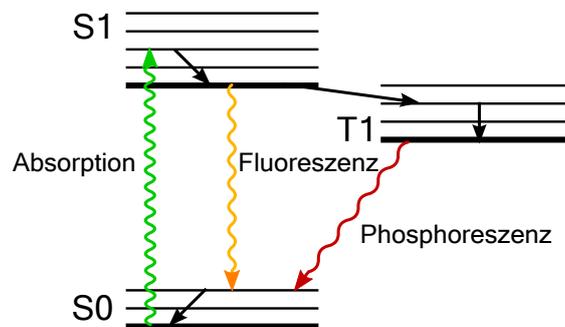


Abbildung 1.1.: Exemplarisches Jablonski Diagramm eines Farbstoffmoleküls.

Da UV-Licht für das menschliche Auge unsichtbar ist, verwendete er einen fluoreszierenden Schirm und stellte fest, dass die Messobjekte eine störende Eigenfluoreszenz aufwiesen [Köh04]. Neben dieser Autofluoreszenz konnten gezielte Methoden entwickelt werden, die zunächst die Anfärbung von Gewebe erlaubten [Paw06, Ste07] und daraufhin die transgene Expression von fluoreszierenden Farbstoffen in lebenden Organismen [Cha94]. Die hierdurch ermöglichten Experimente in Biologie und Medizin rechtfertigten im Jahre 2008 auch die Vergabe des Nobelpreises in Chemie für “die

Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins, GFP” (aus dem Englischen übersetzt) [All11].

Der Fluoreszenzprozess kann, wie bereits angedeutet, mit verschiedenen Farbstofftypen erzielt werden. Der zugrundeliegende Effekt beruht auf der Anregung des Farbstoffes in ein höheres Niveau (z.B. von S_0 in S_1) durch Absorption von Photonen (Abbildung 1.1). Darauf folgt eine Teilmenge der Energie an die Umgebung in Form von Stößen oder thermischer Energie abgegeben. Während dieses Relaxationsprozesses kann auch ein langwelligeres Lichtquant emittiert werden, welches somit zum Fluoreszenzlicht beiträgt. Ein häufig vorkommender Konkurrenzprozess ist der Übergang in die quantenmechanisch “verbotenen” Triplett-Zustände (z.B. T_1), die das Farbstoffmolekül kurzfristig blockieren, bevor der eigentliche Grundzustand (S_0) wieder erreicht wird. Dieser Zustand wird durch dessen chemische Reaktivität unter anderem als Ursache für das Ausbleichen (“photo bleaching”) genannt [Paw06, Kal11, Lak06]. Im Falle der Emission eines Photons bei der Rückkehr von dem Triplett-Zustand in den Grundzustand wird dies als Phosphoreszenz bezeichnet.

Diese vereinfachte Darstellung von Fluoreszenzmolekülen kann nicht alle Prozesse, die an Farbstoffmolekülen beobachtet werden, erklären. Dennoch genügt dieses Modell zum Verständnis aller im Folgenden relevanten Effekte, unter der phänomenologischen Kenntnis der Fluoreszenzlebensdauer.

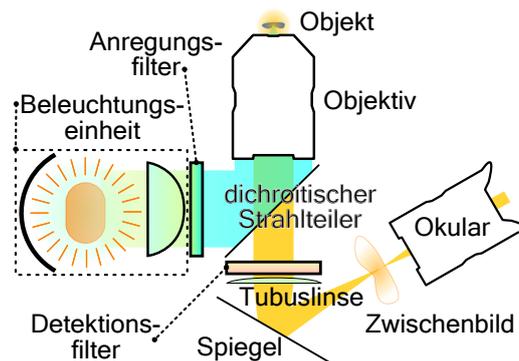


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops.

Vorausgesetzt, dass eine fluoreszierende Probe zur Verfügung steht, ist die gängigste Fluoreszenzmikroskopietechnik die Epifluoreszenzmikroskopie (Abbildung 1.2). Hierbei wird die Probe durch das Objektiv beleuchtet und beobachtet. Eine Lichtquelle, wie z.B. eine Quecksilberdampfampe, wird kollimiert und mit einem Anregungsfilter, häufig ein Bandpassfilter, spektral eingeschränkt. Das gefilterte Anregungslicht wird mit einem dichroitischen (wellenlängenabhängigen) Strahlteiler zum Objektiv geführt und von diesem auf die Probe fokussiert. Das in der Probe entstehende Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv eingefangen und mit einer Tubuslinse vergrößert abgebildet. Die zugehörige Vergrößerung ist üblicherweise auf dem Objektiv angegeben. Hierbei durchquert das Fluoreszenzlicht sowohl den dichroitischen Strahlteiler als auch einen speziellen Fluoreszenzfilter, der das Anregungslicht zusätzlich unterdrückt. Das vergrößert dargestellte Zwischenbild des Objekts wird nun mit einer Kamera oder einem Okular, welches weiter vergrößert, beobachtet.

Obwohl die Lichtmikroskopie ausgiebig verstanden ist, fehlt eine einheitliche und objektive Methodik zur Beschreibung und zum Vergleich verschiedener Mikroskope bzw. Mikroskopietechniken. In Kapitel 2 wird der allgemeine lineare Fall für Fernfeldmikroskope anhand der Wellengleichung hergeleitet. Dieser wird daraufhin genutzt, um einen geeigneten Parameterraum für die Mikroskopcharakterisierung zu erstellen. Weiterhin erlaubt die mathematische Darstellung der Lichtfelder eine Übertragung derselben auf die genaue numerische Beschreibung aller Systemparameter. Diese Simulation fasst alle Systemparameter in einem einheitlichen Schritt zusammen (siehe Kapitel 3).

1.2. Röntgentomographie

1895 entdeckte Wilhelm Conrad Röntgen die nach ihm benannte Röntgenstrahlung [Rön96b, Rön96a], die von ihm noch als X-Strahlung bezeichnet wurde. Für diese Entdeckung erhielt er als Erster den Nobelpreis in Physik [All11]. Zwar war schnell klar, dass diese neue Art der Strahlung geeignet ist, um ganze Menschen zu durchleuchten, allerdings stellte sich die Handhabung als schwierig heraus, da keine Elemente zur gezielten Ablenkung der Strahlung zur Verfügung standen. Daher lassen sich bis heute praktisch nur Projektionsaufnahmen mit Röntgenstrahlen gewinnen. 1973 gelang es Godfrey Newbold Hounsfield [Hou73], die von Johann Radon erarbeiteten theoretischen Grundlagen zur Rückgewinnung der Ebeneninformation anhand der Projektionen [Rad17] mit speziell entwickelter Computertechnik umzusetzen. Dieser Apparat konnte zugleich auf klinische Problemstellungen angewendet werden [Amb73, Per73]. Für diese Entwicklung erhielt er 1979 zusammen mit Allan M. Cormack den Nobelpreis für Medizin [All11].

Um Röntgenstrahlung zu erzeugen, können beispielsweise aus einer Heizkathode in einer Vakuumröhre Elektronen mit einer Hochspannung auf eine Anode aus Metall beschleunigt werden. Bei dem Aufprall der Elektronen wird durch Bremsstrahlung und Stöße mit Atomschalenelektronen Röntgenstrahlung freigesetzt [Dem10]. Bei diesem Vorgehen entsteht divergente und inkohärente Röntgenstrahlung. Mittlerweile existieren Computertomographen, die diese divergenten Strahlquellen (“cone beam”) ideal nutzen können. Da dies allerdings mit höheren Hardwareanforderungen einhergeht, wurden bei den ersten Röntgentomographen unerwünschte Strahlen ausgeblendet, um einen Fächer (“fan beam”) oder ein quasi paralleles Strahlenbündel (“parallel beam”) zu erhalten.

Die technische Entwicklung der Computertomographie (CT) ist auf Grund der vielen benötigten Rechenoperationen stark mit der Entwicklung der Computer bzw. Mikroelektronik verknüpft. Während mit der Umsetzung auf angepassten Field Programmable Gate Array (FPGA) Architekturen und Grafikkarten die Berechnungszeiten immer weiter verkürzt werden [Li05, Sch07, Xu07, Vin09], waren ganze Volumenrekonstruktionen oder iterative Rekonstruktionsalgorithmen zur Artefaktreduktion zu Beginn praktisch nicht umsetzbar [Hou73].

Die Rechenleistung aktueller PC-Systeme in Verbindung mit der Compute Unified Device Architecture (CUDA) auf Grafikkarten erlaubt die Umsetzung neuer, bis

jetzt zu aufwendiger Rekonstruktionsalgorithmen. Der Vergleich und die Theorie zu deren Umsetzung wird in Kapitel 5 erschlossen.

1.3. Optische tomographische Verfahren

Im Jahr 2002 wurde das Prinzip der Computertomographie von James Sharpe [Sha02] auf die Optik übertragen. Diese Art der Mikroskopie wurde von ihm als optical projection tomography (dt.: optische Projektionstomographie) (OPT) bezeichnet. Es existierten bereits mehrere Techniken zur dreidimensionalen Bilderfassung und die meisten Vorteile der OPT kommen erst bei hinreichend großen Proben zum Tragen, welche zudem noch transparent sein müssen. Dennoch konnte sich die OPT als Werkzeug zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragen etablieren. Nachdem die Methodik zur chemischen Aufklärung größerer Proben bereits bekannt war [Spa11], ermöglichte die OPT als einzige Technik die dreidimensionale Erfassung von Absorption und Fluoreszenz an mehreren Millimeter großen Objekten [Sha02]. Dass hiermit eine wissenschaftlich relevante Lücke erschlossen wurde die es erlaubt entwicklungsbiologische Fragestellungen zu beantworten, zeigte sich kurz darauf in Studien an Mäuseembryonen [Sha03b].

Für die Untersuchung kleinerer Proben ist die OPT in ihrer Grundform vergleichsweise ungeeignet. Dies liegt an der Notwendigkeit der Erstellung einer Projektion. Um eine vollständige und korrekte Projektion zu erhalten, muss die Tiefenschärfe des Systems mindestens das halbe Objekt erfassen [Wal07]. Da die Tiefenschärfe von der NA abhängt, hängt auch die Auflösung und die Anzahl der maximalen Messpunkte von der Größe der Probe ab. Kapitel 4 beschäftigt sich unter anderem damit, dass die Auflösung dennoch erhöht werden kann, welche Effekte dabei auftreten und wie die genauen Zusammenhänge zwischen Tiefenschärfe und der Auflösung lauten.

Durch die reduzierte NA wird bei Fluoreszenzaufnahmen außerdem ein Großteil des emittierten Lichtes nicht detektiert. Wie aus Kapitel 4 hervorgeht, ändert auch die erhöhte Auflösung nichts an diesem Sachverhalt. Im Gegenteil: Ein genereller Kontrastverlust reduziert die Empfindlichkeit noch weiter. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine abgewandelte Form der OPT, die scanning laser optical tomography (dt.: scannende laseroptische Tomographie) (SLOTy), entwickelt, welche in der Lage ist, die Empfindlichkeit weit über die der OPT zu steigern [Lor11c]. Die Untersuchung dieser neuen Technik anhand einiger der in Kapitel 2 hergeleiteten Parameter wird in Kapitel 6 durchgeführt.

1.4. Biologische Organismen

Die Prüfung der Anwendbarkeit der in dieser Arbeit umgesetzten Systeme macht es erforderlich, geeignete Modelle aus einem typischen Anwendungsgebiet zu wählen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Gerd Bicker¹ konnte die

¹Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierökologie und Zellbiologie - AG Zellbiologie Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

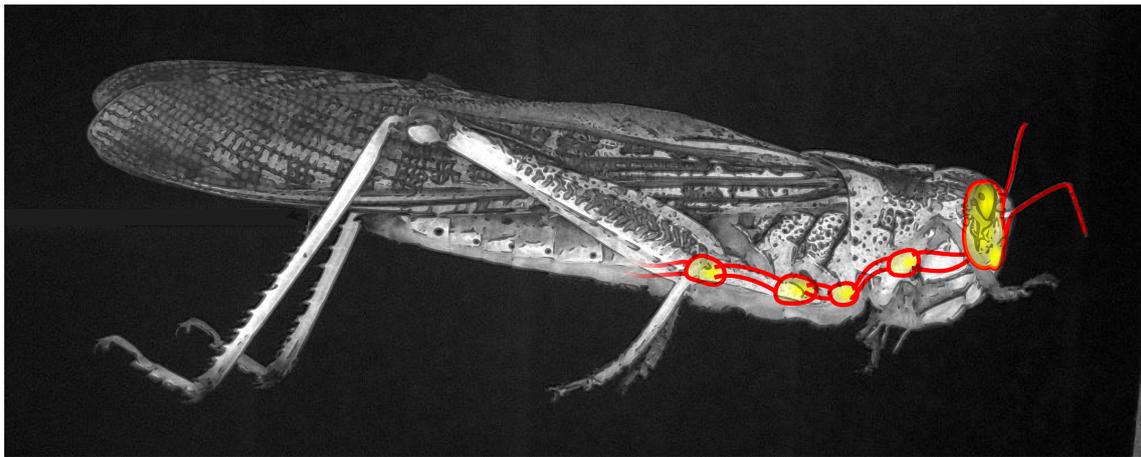


Abbildung 1.3.: Nachbearbeitete Auflichtaufnahme aus einem OPT Datensatz. Sie zeigt eine ausgewachsenen Europäische Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) mit schematischer Andeutung des ZNS. Das Gehirn sowie die ersten vier Nervenknotten/Ganglien [Bur96] sind gelb mit roter Umrandung angedeutet.

Heuschrecke *Locusta migratoria* (europäische Wanderheuschrecke) und im Speziellen deren zentrales Nervensystem untersucht werden.

Die *Locusta migratoria* gehört zur Gattung der *Locusta* (Heuschrecke) aus der Klasse der Insekten. Das zentrale Nervensystem ist im Vergleich zur Körpergröße relativ klein. Das Gehirn sitzt direkt hinter den Augen. Der restliche Kopf ist zu großen Teilen mit Muskelgewebe für die Kaumuskelatur gefüllt. An das Gehirn schließen zwei optische Loben an, die in direktem Kontakt zur Netzhaut der Augen stehen. Zum Bauch hin zweigt die Ganglienkette zur Steuerung der Gliedmaßen vom Gehirn ab. Sie verläuft unterhalb des Brustpanzers und besitzt für Abzweigungen zu den Beinen, Flügeln (thorakal) und den Kauwerkzeugen (suboesophageal) einzelne Ganglien. Die Kette mündet in die Ganglien des Hinterleibs (abdominal). Abbildung 1.3 deutet die Lage des Gehirns und sowie des suboesophagealen und der thorakalen Ganglienknoten an [Bur96].

Durch eine Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Koenemann und seinen Mitarbeitern konnte eine weitere Gattung untersucht werden. Hierbei handelt es sich um die Gattung des *Godzillioptomus* aus der Klasse der *Remipedia*, die zu dem Stamm der Krebstiere zählen. Die Klasse der *Remipedia* wurde 1979 in einer Unterwasserhöhle auf Grand Bahama Island entdeckt. Kurz darauf (1981) veröffentlichte Jill Yager, dass es sich hierbei um eine neue Klasse handelte. Bis jetzt wurden diese Klasse lediglich in Unterwasserhöhlen mit Verbindung zu salzhaltigen Gewässern entdeckt [Yag81, Koe12]. Die Tiere besitzen keine Augen und ein, wie bei Krebstieren üblich, Exoskelett. In ihrer natürlichen Form sind sie weißlich opak bis hin zu transparent und bestehen neben dem Kopf aus sich häufig wiederholenden Segmenten mit jeweils einem Beinpaar (vgl. Kapitel 6 Abbildung 6.8) [Yag81, Koe12]. Die Größe und Transparenz der Organismen zusammen mit ihrer länglichen Form bieten ideale Voraussetzungen für die Messung mit einem optischen Tomographen.

2. Analyse und Beschreibung optischer Systeme

Der Vergleich zwischen unterschiedlichen Systemen zur optischen Abbildung eines Objektes gestaltet sich durch deren große Vielfalt je nach Gegebenheit schwierig bis hin zu unmöglich. Um einerseits ein objektives Urteil fällen zu können und andererseits ein Entscheidungskriterium zu besitzen, wann ein Vergleich generell unmöglich ist, werden in diesem Kapitel die grundlegenden Eigenschaften aller in Frage kommenden Systeme beschrieben, parametrisiert und damit auf geeignete Unterscheidungskriterien zurückgeführt.

Inhalt

2.1. Elektromagnetische Wellengleichung	8
2.2. Quantenmechanische Einschränkungen	10
2.2.1. Photonen	10
2.2.2. Photonenstatistik	11
2.2.3. Energie und Frequenz	12
2.3. Wellenmechanische Abbildung	12
2.3.1. Fourieroptik	12
2.3.2. Ewaldkugel	14
2.3.3. Breite Spektren	16
2.3.4. Zeitliche Propagation und Dispersion	17
2.3.5. (De-)Polarisation und Doppelbrechung	18
2.4. Bildentstehung	19
2.4.1. Faltung	19
2.4.2. Transferfunktionen	20
2.4.3. Wechselwirkungsmechanismen	22
2.4.4. Detektion	24
2.4.5. Optische Kanäle	24
2.5. Parameterraum	25
2.5.1. Ableitung der Systemeigenschaften	25
2.5.2. Ableitung der Probeneigenschaften	29
2.5.3. Nichtlineare Systeme	32
2.5.4. Zusammenfassung der Parameter	34

2.1. Elektromagnetische Wellengleichung

Die elektromagnetische Wellengleichung kann unter der Anwendung einiger Einschränkungen aus den Maxwell-Gleichungen abgeleitet werden. Die Maxwell-Gleichungen, deren physikalische Gültigkeit uneingeschränkt vorausgesetzt wird, lauten:

$$\nabla \cdot \vec{E} = \rho \varepsilon^{-1} \quad (2.1)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\partial_t \vec{B} \quad (2.2)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (2.3)$$

$$\nabla \times \vec{B} = \mu \vec{j} + \mu \varepsilon \partial_t \vec{E} \quad (2.4)$$

Hierbei sind \vec{E} das elektrische Feld, \vec{B} das magnetische Feld, ρ die Ladungsdichte, \vec{j} die Stromdichte, ε die elektrische Suszeptibilität und μ die magnetische Permeabilität. Für die folgenden Abschnitte sind sowohl die notwendigen Einschränkungen der Maxwell-Gleichungen als auch die daraus folgende Wellengleichung von Bedeutung. Zunächst sind die Randbedingungen festzulegen. Dies beinhaltet das für die elektromagnetische Information räumlich homogene Ausbreitungsmedium, welches weder elektrische Ströme leitet ($\vec{j} = 0$) noch elektrostatische Ladung enthält ($\rho = 0$):

$$\partial_x \varepsilon = \partial_y \varepsilon = \partial_z \varepsilon = \partial_x \varepsilon_0 \varepsilon_r = 0 \quad \forall x, y, z \in \mathbb{R} \quad (2.5)$$

$$\partial_x \mu = \partial_y \mu = \partial_z \mu = \partial_x \mu_0 \mu_r = 0 \quad \forall x, y, z \in \mathbb{R} \quad (2.6)$$

$$\nabla \cdot \vec{E} = \rho \varepsilon^{-1} = 0 \quad (2.7)$$

$$\nabla \times \vec{B} = \mu \vec{j} + \mu \varepsilon \partial_t \vec{E} = \mu \varepsilon \partial_t \vec{E} \quad (2.8)$$

Es bleibt festzuhalten, dass die so vereinfachten Maxwell-Gleichungen ein lineares Gleichungssystem mit insgesamt 24 reellen bzw. 12 komplexen Gleichungen darstellen. Daher sind maximal 24 Freiheitsgrade notwendig, um die Lösungsmenge zu beschreiben. Weiterhin stehen drei komplexe elektrische Feldkomponenten, drei komplexe magnetische Feldkomponenten, drei Raumrichtungen und eine Zeitdimension als Basis zur Verfügung. Daher muss die Lösung mit einer Basis aus 16 reellen Dimensionen dargestellt werden. Hieraus folgt, dass das Gleichungssystem überbestimmt ist und falls eine Lösung existiert, diese höchstens 16 Freiheitsgrade besitzt. Des Weiteren sei für alle weiteren Überlegungen gegeben, dass die elektrische Suszeptibilität $\tilde{\varepsilon}$ in Diagonalform vorliegt und die magnetische Permeabilität isotrop ist [Bor99].

Gilt $(\partial_t \vec{E})(\partial_t \mu \varepsilon) \ll \mu \varepsilon \partial_t^2 \vec{E}$, kann die elektrische Wellengleichung mit dem Laplace-Operator $\Delta = \nabla \cdot \nabla = (\partial_x^2 + \partial_y^2 + \partial_z^2)$ und der Lichtgeschwindigkeit im Medium $c' = cn^{-1} = (\mu \varepsilon)^{-1/2}$ in der vertrauteren Form

$$\Delta \vec{E} = \frac{n^2}{c^2} \partial_t^2 \vec{E} \quad (2.9)$$

geschrieben werden. Hierbei wird n allgemein als Brechungsindex bezeichnet. Die

allgemeine Lösung für diese Wellengleichung (2.9) unter der Bedingung, dass $\omega = c'|\vec{k}|$ ist, lautet:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{f}_-(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t) + \vec{f}_+(\vec{k} \cdot \vec{r} + \omega t) \quad (2.10)$$

Sowohl $\vec{f}_-(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)$ als auch $\vec{f}_+(\vec{k} \cdot \vec{r} + \omega t)$ können durch eine Basis von komplexen ebenen Wellen $G(\vec{k}, \omega)e^{i(\vec{k}\vec{r}-\omega t)}$ und $H(\vec{k}, \omega)e^{i(\vec{k}\vec{r}+\omega t)}$ dargestellt werden. Im isotropen Fall stehen die Vektoramplituden \vec{E} , \vec{B} und der Wellenvektor \vec{k} paarweise senkrecht aufeinander [Nol11]. Im anisotropen Fall stehen $\vec{D} = \tilde{\epsilon}\vec{E}$, \vec{B} und der Wellenvektor \vec{k} wiederum paarweise senkrecht aufeinander [Bor99]. Es handelt sich somit um eine transversale Welle. Weiterhin kann festgestellt werden, dass sowohl das elektrische als auch das magnetische Feld in Phase schwingen [Nol11]. Mit anderen Worten, die Lösungen für das elektrische und das magnetische Feld sind redundant. Daher werden für weitere Betrachtungen nur die elektrischen Feldkomponenten berücksichtigt. Durch Entfallen des B-Feldes wird die allgemeine Lösung von maximal 16 auf maximal 10 Freiheitsgrade eingeschränkt. Die endgültige Beschreibung der allgemeinen Lösung, die sowohl die Wellengleichung als auch die Maxwell-Gleichungen eines ungeladenen Nichtleiters erfüllt, lautet somit:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{k} d\omega \vec{\tilde{E}}(\vec{k}, \omega) e^{i(\vec{k}\vec{r}-\omega t)} \quad (2.11)$$

Man beachte, dass $\vec{E}(\vec{r}, t)$ und $\vec{\tilde{E}}(\vec{k}, \omega)$ komplexe Werte annehmen können und diese Gleichung eine 4-dimensionale Fouriertransformation darstellt. Weiterhin ist Gleichung (2.11) in der Lage alle möglichen elektrodynamischen (Fern-)Felder zu beschreiben. Dies ist von Interesse, da abgesehen von einigen Ausnahmen wie scannender Nahfeldmikroskopie [Dun99], praktisch alle Lichtmikroskope lediglich Fernfelder auswerten. Des Weiteren ist auch ersichtlich, dass $\vec{E}(\vec{r}, t)$ durch drei unabhängige (ein Freiheitsgrad für jede elektrische Feldkomponente) vierdimensionale Fouriertransformationen von $\vec{\tilde{E}}(\vec{k}, \omega)$ berechnet werden kann. Bei einer Abbildung der imaginären Werte auf ein reelles System ergeben sich somit insgesamt 10 Freiheitsgrade, die zu berücksichtigen sind: $|\tilde{E}_x|, |\tilde{E}_y|, |\tilde{E}_z|, k_x, k_y, k_z, \omega, \tilde{\varphi}_x, \tilde{\varphi}_y, \tilde{\varphi}_z$ bzw. $|E_x|, |E_y|, |E_z|, x, y, z, t, \varphi_x, \varphi_y, \varphi_z$. Die komplexen Feldkomponenten $E_j = |E_j|e^{i\varphi_j}$ bzw. $\tilde{E}_j = |\tilde{E}_j|e^{i\varphi_j}$ werden hier auf Grund der später einfacheren Handhabung in Polarkoordinaten dargestellt.

Es wurde bereits festgestellt, dass \vec{E} bzw. $\vec{D} = \tilde{\epsilon}\vec{E}$ und \vec{k} bei einer ebenen Welle senkrecht aufeinander stehen und daher durch die Darstellung des Lichtfeldes im Fourierraum in Kugelkoordinaten lediglich 8 Freiheitsgrade benötigt würden. Auf diese Umformung wird an dieser Stelle allerdings verzichtet, da sie für die folgenden Überlegungen keine Hilfe darstellt.

Die Wellengleichung kann auch für ungeladene Leiter gelöst werden [Nol11]. Hierbei ändert sich die allgemeine Lösung nicht, lediglich \vec{k} bzw. n erhalten komplexe

Komponenten, die einer Dämpfung entsprechen. Dieser Aspekt kann weder von einer Fouriertransformation erfasst werden, noch erlaubt er eine freie Propagation von Licht über längere Strecken. Daher wird er in den folgenden Abschnitten nicht weiter verfolgt.

2.2. Quantenmechanische Einschränkungen

So genau die Maxwell-Gleichungen auch das Verhalten der Lichtfelder vorhersagen können, ist es praktisch unmöglich die Qualität eines optischen Systems vollständig zu beurteilen, ohne dessen quantenmechanische Eigenschaften zu berücksichtigen. Um die Einschränkung, die das System hierdurch erfährt, zu verdeutlichen, werden hier die Quantenmechanik des Lichts und dessen Konsequenzen erläutert.

2.2.1. Photonen

Photonen sind die „Teilchensorte“, die den Anstoß zur Quantenmechanik gaben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ihre typischen Energien weit entfernt von der thermischen Energie der Umgebungstemperatur liegen, allerdings wiederum nahe an chemischen Bindungsenergien. Der photoelektrische Effekt, also das auslösen von Elektronen aus Metallen durch die Bestrahlung mit Licht und die Tatsache, dass die kinetische Energie der ausgelösten Elektronen nur von der Wellenlänge des Lichts abhängt, verleitete Albert Einstein als Ersten dazu, eine Beziehung zwischen Wellen und Teilchen zu postulieren [Ein05]. Hierfür erhielt er den Nobelpreis in Physik [All11].

Die Konsequenz ist, dass ein Objekt in oder hinter einem Medium aus Materie nicht mit beliebig kurzen Wellenlängen bzw. hochenergetischen Photonen beobachtet werden kann, da ab einer gewissen Energie die chemischen Bindungen des Mediums absorbierend wirken. Auch inerte Gase wie z.B. Helium, das erst bei Photonenenergien von knapp 24 eV ionisiert wird, absorbieren bereits im Sichtbaren und Infraroten [Dem10]. In wässrigen Medien steigt die Absorption unterhalb von 200 nm Wellenlänge sprunghaft an, bis bei ca. 170 nm Wellenlänge die Eindringtiefe auf 10 μm abfällt [Wee63]. Dies stellt eine starke Einschränkung bei der Untersuchung biologischer Proben dar. Aus denselben Gründen kann ein auf chemischen Verbindungen basierender Farbstoff nicht beliebig kurze Wellenlängen absorbieren bzw. emittieren. Bei einem Absorptionsereignis ist in der Regel auch lediglich genau ein Photon beteiligt. Umgekehrt wird bei einem Emissionsereignis genau ein Photon abgegeben.

Weiterhin ist von Bedeutung, dass ein Photon nicht als klassisches Teilchen verstanden wird, das auf einem zufälligen Weg den Detektor erreicht. Vielmehr muss man es als minimale Energieeinheit des elektromagnetischen Feldes aus Gleichung (2.11) verstehen. Die Welle breitet sich klassisch aus, darf ihre Energie allerdings nur in einzelnen Photonenstufen an den Detektor übergeben. Daher kann die Wellenmechanik zwar korrekte Vorhersagen über die Amplitudenverteilung des Lichts geben,

allerdings ohne die „Photonenstufen“ zu berücksichtigen keine Vorhersagen über das Rauschverhalten der Messung treffen.

2.2.2. Photonenstatistik

Die meisten optischen Systeme mit Detektor dienen dazu ein Objekt zu untersuchen. Das Objekt ist einer deutlich feineren Quantelung als der des Lichts unterworfen. Folglich dominiert das statistische Verhalten der Photonen und/oder der elektromagnetischen Wechselwirkung das Rauschverhalten des Messsignals. Die Emission und Detektion eines Photons ist ein Zufallsprozess. Dieser Prozess wird auch als Schrotrauschen bezeichnet.

Für eine theoretische Beschreibung kann die Zeit stets so fein gestückelt werden, dass sichergestellt ist, dass maximal ein Photon pro Zeitintervall detektiert wird. Dieses Photon / kein Photon Experiment ist mit dem häufigen Werfen einer Münze vergleichbar und kann daher durch einen Bernoulli-Prozess beschrieben werden. Die Wahrscheinlichkeit $P_{\text{Bernoulli}}$ der Bernoulli-Verteilung in Abhängigkeit von den Erfolgen k , der Erfolgswahrscheinlichkeit p^* und der Anzahl der Versuche m lautet [Mer01, Bro08]:

$$P_{\text{Bernoulli}}(k, m, p^*) = \binom{m}{k} (p^*)^k (1 - p^*)^{m-k} \quad (2.12)$$

$$\mu_{\text{Bernoulli}} = mp^* \quad ; \quad \sigma_{\text{Bernoulli}} = \sqrt{mp^*(1 - p^*)} \quad (2.13)$$

Es fällt auf, dass die Standardabweichung σ für $p = 0$ und $p = 1$ verschwindet. Der Erwartungswert $\mu_{\text{Bernoulli}}$ liegt bei den im Mittel detektierten Photonen. Für geringe Wahrscheinlichkeiten und häufige Wiederholungen der Messungen geht die Bernoulli Statistik in die Poisson-Statistik mit der Wahrscheinlichkeit P_{Poisson} über [Mer01, Bro08]:

$$P_{\text{Poisson}}(m, p^*) = \frac{\gamma^m}{m!} e^{-\gamma} \quad (2.14)$$

$$\mu_{\text{Poisson}} = \gamma = mp^* \quad ; \quad \sigma_{\text{Poisson}} = \sqrt{\gamma} = \sqrt{mp^*} \quad (2.15)$$

Hiermit können nun Vorhersagen über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, kurz SNR [Paw06] gemacht werden. Wird zusätzlich beachtet, dass die Anzahl der detektierten oder emittierten Photonen $mp^* = \mu$ proportional zur Intensität I des Signals ist, folgt:

$$\text{SNR}_{\text{Bernoulli}} = \frac{\mu_{\text{Bernoulli}}}{\sigma_{\text{Bernoulli}}} = \sqrt{\frac{mp^*}{1 - p^*}} = \sqrt{\frac{\mu_{\text{Bernoulli}}}{1 - p^*}} = \sqrt{\frac{I}{1 - p^*}} \quad (2.16)$$

$$\text{SNR}_{\text{Poisson}} = \frac{\mu_{\text{Poisson}}}{\sigma_{\text{Poisson}}} = \sqrt{mp^*} = \sqrt{\mu} = \sigma_{\text{Poisson}} = \sqrt{I} \quad (2.17)$$

Gleichung (2.17) zeigt das für optische Messungen typische Verhalten. Die Messge-

naugigkeit skaliert mit der Wurzel der Intensität. Das SNR der Bernoulli Verteilung ist für alle praktischen Anwendungen ($p^* \ll 1$) identisch zu dem SNR der Poisson Verteilung. Wird allerdings die Emission der Photonen stark kontrolliert und steigt in Kombination hiermit die Wahrscheinlichkeit je Zeitintervall genau ein Photon und nicht mehr zu detektieren auf über 20% an, muss die Bernoulli Verteilung berücksichtigt werden, da ab diesem Punkt das $SNR_{Bernoulli}$ bereits um 13% von dem $SNR_{Poisson}$ abweicht.

2.2.3. Energie und Frequenz

Wie bereits erwähnt, ist der photoelektrische Effekt einer der ersten quantenmechanischen Effekte, die beobachtet wurden. Er beruht auf der Tatsache, das Licht Elektronen aus Metallen auszulösen vermag. Dabei hängt die kinetische Energie der ausgelösten Elektronen nicht - wie damals erwartet - von der Intensität, sondern der Frequenz ν des eingestrahltten Lichtes ab [Dem10]. Bei einer quantitativen Auswertung eines solchen Experiments unter der Kenntnis der Elementarladung $e^- = 1,602 \cdot 10^{-19} C$. folgt für die Energie E_{Ph} eines Photons:

$$E_{Ph} = h\nu$$

mit dem Planckschen-Wirkungsquantum $h = 6,626 \cdot 10^{-34} Js = 4,1357 \cdot 10^{-15} eVs$ [Dem10]. Dieser Zusammenhang legt die Wahl der Frequenz bzw. Wellenlänge als Basis nahe. Bei der Wechselwirkung mit Materie vereinfacht dies die Betrachtungen durch den eingeschränkten Energiebereich bzw. die Einschränkungen der Niveaus. Dies stimmt mit der in 2.1 gewählten Basis für die Lösung der Wellengleichung überein. Des Weiteren ist in homogenen Medien der Brechungsindex meist frequenzabhängig (Dispersion) und so wiederum gut darstellbar [Dem99].

2.3. Wellenmechanische Abbildung

Wie in den Abschnitten 2.1 und 2.2.3 verdeutlicht, stellt die Repräsentation von Lichtfeldern im Frequenzraum eine zu bevorzugende Basis für Abbildungen von Materie mittels Lichts dar. In der Tat lassen sich grundlegende Geometrien der Lichtfelder im Frequenzraum ableiten, die in der Lage sind, viele optische Systeme exakt zu repräsentieren. Für die folgenden Betrachtungen wird davon ausgegangen, dass die hintere Fokalebene einer Linse oder eines Mikroskopobjektivs bekannt ist.

2.3.1. Fourieroptik

Die Fourieroptik beschreibt den Zusammenhang kohärenter Lichtfelder $E(x, y)$ in den beiden Fokusebenen in den Abständen f_1 und f_2 zu einer Linse. Es gelte $f = f_1 = f_2$, dann lautet die mathematische Beschreibung [Dem99]:

$$E_{f1}(x_1, y_1) = A_{\text{norm}} \int_{-\infty}^{\infty} dx_2 dy_2 E_{f2}(x_2, y_2) e^{\frac{2\pi i}{f\lambda}(x_1 x_2 + y_1 y_2)} \quad (2.18)$$

wobei A_{norm} einen Normierungsfaktor darstellt. Gleichung (2.18) ist eine Fouriertransformation und kann so mit dem Skalierungsfaktor $\frac{1}{f\lambda}$ zusammengefasst werden zu:

$$E_{f_1}\left(\frac{x_1}{f\lambda}, \frac{y_1}{f\lambda}\right) = A_{\text{norm}} \text{FT}_{xy}[E_{f_2}(x_2, y_2)] \quad (2.19)$$

Um diesen mathematisch und speziell numerisch leicht handhabbaren Zusammenhang zu verstehen, ist lediglich das Superpositionsprinzip für ebene Wellen und die Abbildung einer Punktlichtquelle mit einer Linse zu berücksichtigen.

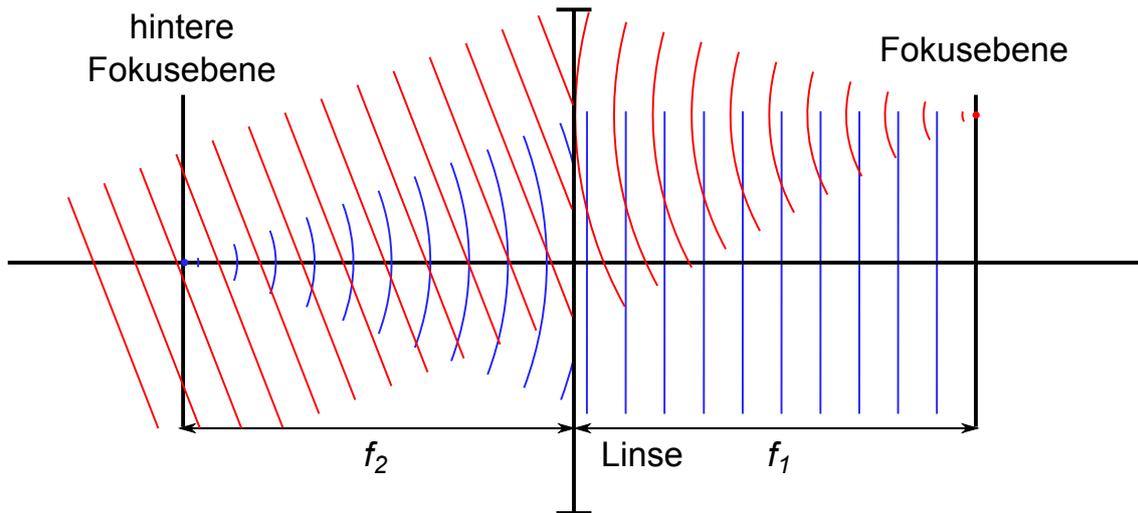


Abbildung 2.1.: Feldtransformation einer dünnen Linse. Eine lateral versetzte Punktlichtquelle in der Fokusebene erzeugt eine verkippte ebene Welle (rot) in der hinteren Fokusebene. Umgekehrt erzeugt eine auf der optischen Achse liegende Punktlichtquelle in der hinteren Fokusebene eine ebene Welle konstanter Phase in der Fokusebene.

Eine zeitlich kohärente Punktlichtquelle wird von einer Linse oder einem Objektiv kollimiert, wenn sie sich in dessen Fokusebene befindet (rote Welle in Abbildung 2.1). Ein so kollimierter Lichtstrahl kann in guter Näherung als ebene Welle angesehen werden. Diese ebene Welle propagiert nun durch die zweite, hintere Fokalebene, wobei die Richtung der Welle mit der Position der Punktlichtquelle (PLQ) in der Fokusebene über die so genannte Strahlprojektionsfunktion (vgl. Abschnitt 2.3.2) zusammenhängt. Nach der geometrischen Optik gilt für eine dünne Linse näherungsweise:

$$E_{\text{ebeneWelle}}(x_1, y_1) \approx A_{\text{norm}} E_{\text{PLQ}}(x_2, y_2) e^{i\left(\frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{x_2}{f} x_1 + \frac{y_2}{f} y_1\right) - \omega t + \varphi(x_2, y_2)\right)} \quad (2.20)$$

Mikroskopobjektive sind im allgemeinen so gestaltet, dass diese Beziehung exakt gilt [Gu00]. Liegt die Punktlichtquelle im Ursprung bzw. auf der optischen Achse, vereinfacht sich diese Formel.

$$E_{\text{ebeneWelle}}(x_1, y_1) \approx A_{\text{norm}} E_{\text{PLQ}}(x_2, y_2) e^{i(-\omega t + \varphi(x_2, y_2))} \quad (2.21)$$

Die Phase der ebenen Welle ist konstant über die gesamte Fokalebene. Da eine dünne Linse in beide Richtungen dieselbe Feldtransformation durchführt, gilt diese Beziehung auch umgekehrt (blaue Welle in Abbildung 2.1). Dies erlaubt den Schluss, dass $\varphi(x_2, y_2)$ in den gegenüberliegenden Fokalebene stets konstant ist und daher zu Null gewählt werden kann. Bei Besetzung der hinteren Fokalebene mit beliebig vielen Punktlichtquellen gleicher Wellenlänge superpositionieren die hierdurch erzeugten ebenen Wellen in der Fokalebene. Die effektive elektrische Welle lautet somit:

$$E_{\text{ebeneWelle}}(x_1, y_1) = A_{\text{norm}} \int_{-\infty}^{\infty} dx_2 dy_2 E_{\text{PLQ}}(x_2, y_2) e^{i(\frac{2\pi}{\lambda}(\frac{x_2}{f} x_1 + \frac{y_2}{f} y_1) - \omega t)} \quad (2.22)$$

Da in der Optik lediglich gemittelte Intensitäten detektiert werden, wird hier der zeitliche Term ωt zu einem willkürlichen Zeitpunkt $t = 0$ ausgewertet. Es folgt die Formulierung aus Gleichung (2.18).

2.3.2. Ewaldkugel

Die Ewaldkugel wird üblicherweise genutzt, um die Bragg-Bedingung im reziproken Gitter zu konstruieren, bzw. zu veranschaulichen [Ash05]. Hierbei wird genutzt,

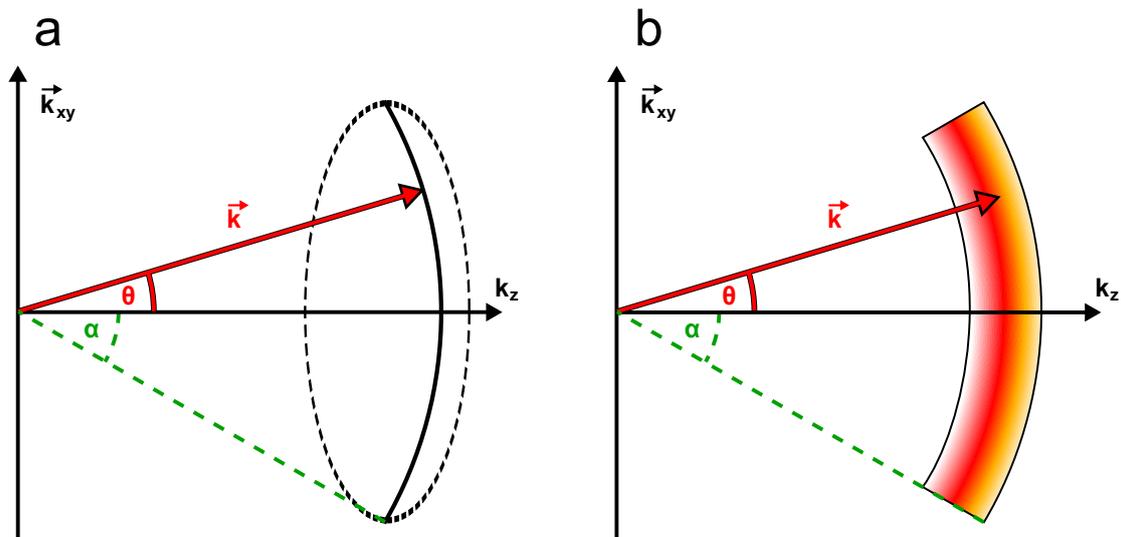


Abbildung 2.2.: Rotationssymmetrische Teildarstellung der Ewaldkugel. θ ist der Winkel zwischen \vec{k} und k_z , α ist der maximale Öffnungswinkel und gibt so mit $|\vec{k}|$ die Größe eines Kugelschnittes vor. (a) Darstellung eines unendlich dünnen Ewaldkugelschnittes. (b) Querschnitt durch eine Ewaldkugelschale mit einem beschränkten Spektrum.

dass kohärente ebene Wellen, die in unterschiedliche Richtungen propagieren, im Fourier- (/Reziproken-) Raum alle auf einer Kugeloberfläche mit dem Radius $|\vec{k}|$ liegen (Abbildung 2.2a). Dies gilt auch für Laserstrahlen, die aus unterschiedlichen Richtungen auf einen Punkt zulaufen [Gu00].

Ein fokussierter Dauerstrich- (englisch: continuous wave) (cw)-Laserstrahl kann im Fourierraum somit lediglich durch Punkte auf der Ewaldkugel beschrieben werden. Es ist nun von der Optik und dem ausleuchtenden Laserstrahl abhängig, welche Amplitude und Phase ein jeder dieser Punkte besitzt.

Hierzu muss die Strahlprojektionsfunktion der Optik

$$g(\theta) = \frac{r}{f} \quad (2.23)$$

bekannt sein. Die Kenntnis von $g(\theta)$ erlaubt es den Radius r in der hinteren Fokalebene mit der Verkippung θ im Fokusvolumen zu verknüpfen. So kann die Apodisationsfunktion $P(\theta)$ der einfallenden Kugelwelle durch die Pupillenfunktion der hinteren Fokalebene $\hat{P}(r)$ ausgedrückt werden [Gu00].

$$P(\theta) = \hat{P}(r) \sqrt{\frac{g(\theta) \partial_\theta g(\theta)}{\sin \theta}} = \hat{P}(f g(\theta)) \sqrt{\frac{g(\theta) \partial_\theta g(\theta)}{\sin \theta}} \quad (2.24)$$

Viele Objektivse sind nach der Sinusbedingung, die $g(\theta) = \sin(\theta)$ fordert, gefertigt [Gu00]. Dies vereinfacht Gleichung (2.24) zu:

$$P(\theta) = \hat{P}(r) \sqrt{\cos \theta} = \hat{P}(f \sin(\theta)) \sqrt{\cos \theta} \quad (2.25)$$

Gleichung (2.25) kann nun genutzt werden, um die Beziehung zwischen der rückwärtigen Fokalebene und der Feldverteilung auf der Ewaldkugel zu beschreiben. Auf Grund der Rotationssymmetrie optischer Komponenten sind sowohl die Strahlprojektionsfunktion (2.23) als auch die Apodisations- und Pupillenfunktion (2.25) rotationssymmetrisch um die optische Achse.

Diese Zuordnungen können nun genutzt werden, um $\vec{E}(k, \omega)$ aus Formel (2.11) zu bestimmen. Wenn $\omega = \omega_0$ konstant und damit unabhängig von \vec{k} ist, kann $\vec{E}(\vec{k}, \omega)$ mit einer Dirac-Funktion $\delta(\omega - \omega_0)$ in $\vec{E}(\vec{k}, \omega) \delta(\omega - \omega_0)$ faktorisiert werden. Die Lösung der zeitlichen Fouriertransformation kann somit getrennt durchgeführt werden und ergibt:

$$\int_{-\infty}^{\infty} d\omega \vec{E}(\vec{k}, \omega) \delta(\omega - \omega_0) e^{-i\omega t} = \vec{E}(\vec{k}) e^{-i\omega_0 t} \quad (2.26)$$

So ist das Problem auf eine dreidimensionale Fouriertransformation reduzierbar. Durch eine dreidimensionale Fouriertransformation vom Wellenvektor in den Ortsraum kann nun das Fokusfeld ermittelt werden.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = e^{-i\omega_0 t} \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{k} \vec{E}(\vec{k}) e^{i\vec{k}\vec{r}} \quad (2.27)$$

Da lediglich der Phasenfaktor $e^{-i\omega_0 t}$ noch eine zeitliche Komponente enthält, folgt dass die Intensität im betrachteten Volumen zeitlich konstant ist. Der Einfachheit halber wird $t = 0$ und somit $e^{-i\omega_0 t} = 1$ gesetzt.

$$\vec{E}(\vec{r}, t = 0) = \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{k} \vec{\tilde{E}}(\vec{k}) e^{i\vec{k}\vec{r}} \quad (2.28)$$

Wird nun für $\vec{\tilde{E}}(\vec{k})$ die projizierte Ewaldkugel

$$\vec{\tilde{E}}(\vec{k}) = A_{\text{norm}} \delta(k_{\text{Ewald}} - |\vec{k}|) \frac{P(\theta)}{\hat{P}(r(\theta))} \vec{E}_{\text{Fokalebene}}(x, y) \quad (2.29)$$

$$= A_{\text{norm}} \delta(k_{\text{Ewald}} - |\vec{k}|) \frac{P(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z))}{\hat{P}(r(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z)))} \vec{E}_{\text{Fokalebene}} [r(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z)) \vec{n}\vec{e}_x, r(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z)) \vec{n}\vec{e}_y] \quad (2.30)$$

eingesetzt, ergibt die Lösung das elektrische Feld des Fokus bzw. die Punktsprefunktion der Linse oder des Objektivs. Hierbei ist $\vec{n} = \frac{\vec{k}}{|\vec{k}|}$, $r(\theta) = fg(\theta)$, k_{Ewald} der Radius der Ewaldkugel und \vec{e}_i für $i = x; y; z$ der Einheitsvektor in der jeweiligen Richtung. Das Verhältnis von $P(\theta)$ zu $\hat{P}(r)$ wurde hier als Vorfaktor aus der rotationssymmetrischen Abbildung für das nicht zwangsläufig rotationssymmetrische elektrische Feld genutzt.

2.3.3. Breite Spektren

Bei einer infinitesimal dünnen Ewaldkugel handelt es sich um eine ideale Beschreibung einer monochromatischen Lichtquelle. In der Realität existiert keine Strahlungsquelle, die keinerlei Variation in ihrer Wellenlänge besitzt. Zwar stellt dies bei den meisten Laserstrahlquellen eine sehr gute Näherung dar, wird allerdings eine Ultrakurzpulslaserquelle oder eine klassische inkohärente Strahlenquelle eingesetzt, ergibt sich automatisch eine Verbreiterung des Spektrums. Dies äußert sich durch eine Verdickung der Ewaldkugel, welche so zu einer Kugelschale mit dem inneren Radius des kleinsten Wellenvektors k_{Ewald}^{\min} und dem äußeren Radius des größten Wellenvektors k_{Ewald}^{\max} wird (Abbildung 2.2b). Jeder dieser Wellenvektoren besitzt wiederum eine eigene Phase, die im Falle der inkohärenten Lichtquelle in radialer Richtung rein statistisch ausfällt. Für einen fs-Laser, der auf der Modenkopplung basiert, sind die Phasendifferenzen zwischen den Wellenlängen festgelegt und bei einem stabilen Betrieb bestimmbar. Zusammen mit der Kenntnis des Spektrums, erlaubt dies, wie zuvor $\vec{\tilde{E}}(k, \omega)$ zu bestimmen und das elektrische Feld im Orts-Zeitraum mit der vierdimensionalen Fouriertransformation aus Gleichung (2.11) zu berechnen. Soll der Fokus zum Zeitpunkt, in dem der Lichtpuls diesen durchläuft, berechnet werden, kann das Feld zum Zeitpunkt $t = 0$ ausgewertet werden. Hierfür muss lediglich der lineare Phasenterm zwischen den Moden zuvor abgezogen werden, da dieser äquivalent zu einer Zeitverschiebung im nicht dispersiven Medium ist. Gleichung (2.11) vereinfacht sich so zu:

$$\vec{E}(\vec{r}, t = 0) = \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{k} d\omega \vec{E}(\vec{k}, \omega) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \underbrace{\omega t}_{=0})} = \int_{-\infty}^{\infty} dk \tilde{E}(\vec{k}) e^{i\vec{k}\vec{r}} \quad (2.31)$$

Hierbei gilt der Zusammenhang $\vec{E}(\vec{k}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\omega \vec{E}(\vec{k}, \omega)$. Diese Integration ist trivial, da $\vec{E}(\vec{k}, \omega)$ im Normalfall lediglich für einen Wert von ω von null verschieden ist. Die Frequenz ω und der Wellenvektor $|\vec{k}|$ können über den aus Gleichung (2.10) geforderten Zusammenhang $\omega = c'|\vec{k}|$ mit $c' = \frac{c}{n}$ verknüpft werden. Dies erlaubt es ω in Abhängigkeit von $|\vec{k}|$ und n auszudrücken: $\omega(|\vec{k}|, n) = c \frac{|\vec{k}|}{n}$. Nun kann wiederum analog zu Gleichung (2.29) das Feld der Ewaldkugel bestimmt werden.

$$\tilde{E}(\vec{k}) = A_{\text{norm}} \square \left(\frac{|\vec{k}| - k_{\text{Ewald}}^{\min}}{\Delta k_{\text{Ewald}}} - \frac{1}{2} \right) \frac{P(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z))}{\tilde{P}(r(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z)))} \cdot E_{\text{Fokalebene}} \left[r(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z)) \vec{n}\vec{e}_x, r(\arccos(\vec{n}\vec{e}_z)) \vec{n}\vec{e}_y, \omega(|\vec{k}|, n) \right] \quad (2.32)$$

$$\square(x) = \begin{cases} 1 & \text{wenn } |x| \leq \frac{1}{2} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.33)$$

$\square(x)$ wird als Rechteckfunktion bezeichnet und an späterer Stelle wieder verwendet. $\Delta k_{\text{Ewald}} = k_{\text{Ewald}}^{\max} - k_{\text{Ewald}}^{\min}$ ist die Dicke der Ewaldkugelschale im Frequenzraum.

2.3.4. Zeitliche Propagation und Dispersion

Da $\omega(|\vec{k}|, n) = c \frac{|\vec{k}|}{n}$ strikt monoton von $|\vec{k}|$ abhängt, gilt $\vec{E}(\vec{k}) = \int d\omega \vec{E}(\vec{k}, \omega)$. Dies erlaubt es, die Integration über ω aus Gleichung (2.11) zu eliminieren.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{k} \vec{E}(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \frac{|\vec{k}|}{n} ct)} \quad (2.34)$$

Dieses Ergebnis kann auch geometrisch erklärt werden. Die Kugelschale aus 2.3.3 besteht aus einer Ansammlung von Ewaldkugeln, von der jede einzelne mit einer anderen Frequenz $\omega(|\vec{k}|, n) = c \frac{|\vec{k}|}{n}$ schwingt. Ist das Medium dispersiv und damit auch n abhängig von $|\vec{k}|$, ergibt sich für strikt monotone Verläufe von $\omega(|\vec{k}|) = c \frac{|\vec{k}|}{n(|\vec{k}|)}$ eine allgemeinere Form der Gleichung (2.34).

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{k} \vec{E}(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \frac{|\vec{k}|}{n(|\vec{k}|)} ct)} \quad (2.35)$$

Entfällt das strikt monotone Verhalten von $\omega(|\vec{k}|)$, muss das Integral wieder über die Frequenz ausgewertet werden.

2.3.5. (De-)Polarisation und Doppelbrechung

Durch die Brechung eines Lichtstrahls wird seine Propagationsrichtung verändert. Da es sich vor und nach der Brechung um eine transversale Welle handelt, werden auch die Polarisationsrichtungen in dem räumlichen Bezugssystem verändert. Bei der Brechung an Optiken wird dies als Depolarisation bezeichnet. Um so stärker die Brechkraft eines Objektivs ist, desto stärker ist auch dieser Effekt. Hierdurch treten Feldkomponenten in allen drei Raumrichtungen auf, die jeweils separat voneinander betrachtet werden können [Arn07].

Ist der Brechungsindex des umgebenden Mediums nun noch zusätzlich abhängig von der Polarisation der propagierenden Welle, wird dies als Doppelbrechung bezeichnet. In 2.1 wurde bereits festgestellt, dass in diesem Fall statt \vec{E} , $\vec{D} = \tilde{\epsilon}\vec{E}$ senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung steht. Da auf die Reduktion auf 8 Dimensionen verzichtet wurde, muss Gleichung (2.11) nicht weiter verändert werden. Dennoch ist der Zusammenhang zwischen \vec{k} und ω nun abhängig von den Elektrischen Feldkomponenten zu betrachten. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit, darf von einem diagonalisierten Brechungsindextensor $\tilde{\mathbf{n}}$ ausgegangen werden:

$$\tilde{\mathbf{n}} = \begin{pmatrix} n_x & 0 & 0 \\ 0 & n_y & 0 \\ 0 & 0 & n_z \end{pmatrix}$$

und es folgt:

$$|\vec{k}| = \frac{\omega_i}{c'_i} = n_i \frac{\omega_i}{c} \iff \omega_i = \frac{|\vec{k}|}{n_i} c \quad (2.36)$$

Anders formuliert: Die elektrischen Feldkomponenten schwingen bei gleicher Ausbreitungsrichtung und Wellenlänge mit unterschiedlichen Frequenzen. Daher kann analog zu Formel (2.35), für anisotrope Medien mit einem diagonalisierten Brechungsindextensor, eine analoge Beziehung gefolgert werden.

$$\begin{pmatrix} E_x(\vec{r}, t) \\ E_y(\vec{r}, t) \\ E_z(\vec{r}, t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \int d\vec{k} \tilde{E}_x(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \frac{|\vec{k}|}{n_x} ct)} \\ \int d\vec{k} \tilde{E}_y(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \frac{|\vec{k}|}{n_y} ct)} \\ \int d\vec{k} \tilde{E}_z(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \frac{|\vec{k}|}{n_z} ct)} \end{pmatrix} \quad (2.37)$$

Auf die Änderung der Feldamplituden wird an dieser Stelle nicht eingegangen, da dieser Effekt stark von den Bedingungen des Strahleintritts in das Medium abhängt. Letztendlich wird sowohl zur Beschreibung des Depolarisationseffektes als auch für den Eintritt in das doppelbrechenden Medium für jedes $\tilde{E}_i(\vec{k})$ eine eigene Formel zur Abbildung von $\vec{E}_{\text{Fokalebene}}(x, y)$ auf die Ewaldkugel benötigt. Eine allgemeine Abbildungsfunktion für den Depolarisationseffekt wird in Kapitel 3 berechnet.

2.4. Bildentstehung

Um den gesamten Messprozess eines optischen Systems zu erfassen, genügt es nicht eine exakte Beschreibung der beteiligten Lichtfelder zu besitzen. Allgemein enthält ein Prozess, der auf Licht basiert, einen oder mehrere dieser Schritte:

1. Eine oder mehrere Lichtquellen emittieren primäres Licht.
2. Ein optisches System transportiert dieses Licht in das Zielvolumen.
3. Im Zielvolumen findet eine Wechselwirkung zwischen dem Licht und dem zu messenden Objekt statt. Daher kann das Zielvolumen auch als Wechselwirkungsvolumen bezeichnet werden. Hierdurch wird das Licht entweder ab- bzw. umgewandelt, oder gänzlich in eine andere Energieform überführt (z.B. akustische Wellen).
4. Umgekehrt kann eine nicht auf Licht basierende Wechselwirkung zu einer Emission von Licht führen.
5. Ein optisches System transportiert das Licht vom Wechselwirkungsvolumen zu einem oder mehreren Detektoren.

Die Art des optischen Systems sei hier nicht weiter spezifiziert. Es können praktisch alle quantenmechanisch erlaubten Operationen auf dem Hin- und dem Rückweg mit dem Licht durchgeführt werden. Als Beispiele seien hier Frequenzfilter, Fourierfilter oder Interferometer genannt. Von besonderem Interesse sind im Folgenden die Punkte 2, 3 und 5.

2.4.1. Faltung

Wird ein Objekt mit einer Optik abgebildet, so ist der Detailgrad, den diese Abbildung erreicht, durch die Optik limitiert. Man spricht auch von dem Auflösungsvermögen der Optik. Dies liegt daran, dass meist nur ein limitierter Öffnungswinkel und ein beschränkter Wellenlängenbereich genutzt werden können. Die Superposition aller nutzbaren Wellen kann daher in Gleichung (2.11) keine beliebig kleinen örtlichen Feldvariationen darstellen. Um eine anschauliche Vorstellung von dem Auflösungsvermögen des Systems zu gewinnen, wird häufig dessen Fokus dargestellt. Hierbei handelt es sich um die Intensitätsverteilung im Fokusvolumen, die durch eine ebene Welle in der hinteren Fokalebene hervorgerufen wird. Die ebene Welle wird gewählt, da weitere Linsen diese wiederum als Fokus bzw. Punkt auf einen Detektor abbilden können und so ein Bild entsteht. Die Intensitätsverteilung ist hierbei ein Gewichtungsfaktor, der darstellt wie viel Licht aus den benachbarten Volumenelementen zu dem letztlich detektierten Signal $S(x)$ am Detektionspunkt beitragen. Da dies für jeden Detektionspunkt gilt, handelt es sich um das Äquivalent der mathematischen Faltung von dem Lichtintensitätsfeld $I(x)$, das von dem Objekt emittiert wird, mit der Gewichtungsfunktion dem „Fokus“, die als Punktspreads-Funktion $PSF(x)$ bezeichnet wird.

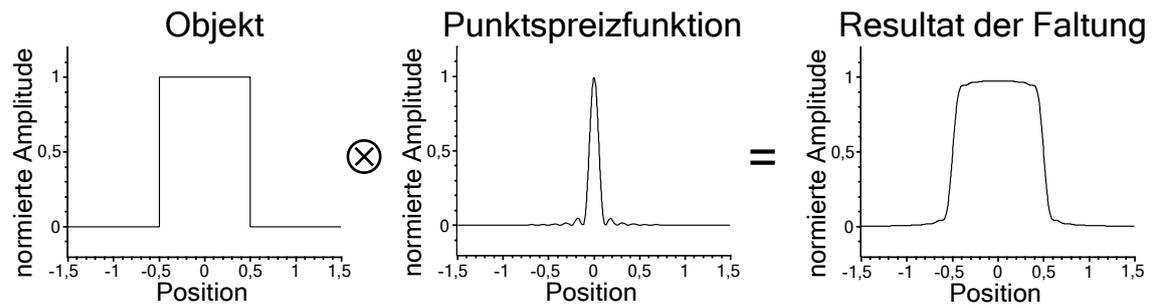


Abbildung 2.3.: Grafische Darstellung einer Faltungsoperation mit einer Rechteckfunktion und einer quadrierten sinc-Funktion.

$$S(x) = I(x) \otimes \text{PSF}(x) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x') \text{PSF}(x - x') dx' \quad (2.38)$$

Abbildung (2.3) veranschaulicht diesen Sachverhalt. Hierbei wird die Emissionsrichtung des Lichtes vom Objekt vernachlässigt, was streng genommen falsch ist, da z.B. Fluorophore anisotrope Eigenschaften besitzen [Lak06]. Für eine genügend homogene Emission bei geringen Aperturen ist die Emissionsrichtung jedoch vernachlässigbar. Um die Emissionsrichtung, wie sie bei der statistischen und fluoreszenten Streuung an Bedeutung gewinnt, zu berücksichtigen, müsste das emittierte Lichtfeld des Objekts bekannt sein und daraus im Fourierraum die von dem System detektierte Kugelschale ausgeschnitten werden. Die so gefensterte Emission gibt die korrekte Intensitätsverteilung wieder, die vom System noch übertragen wird.

2.4.2. Transferfunktionen

Um das begriffliche Chaos, das im Zusammenhang mit der Fokussimulation (Kapitel 3) und der Auswertung mit Transferfunktionen auftreten kann, zu ordnen, wird hier ein Überblick über die Zusammenhänge der Amplituden-Punktspreizfunktion (APSF), Intensitäts-Punktspreizfunktion (IPSF), Kohärenztransferfunktion (CTF), optische Transferfunktion (OTF), Modulationstransferfunktion (MTF) und Phasentransferfunktion (PTF) gegeben [Gu00, Wil02]. Grafik 2.4 stellt die Zusammenhänge für den eindimensionalen Fall dar. Da alle Operationen in jeder Dimension separat ausgeführt werden können, gelten diese Aussagen für alle drei Raumrichtungen.

Prinzipiell sind die Fouriertransformationen zwischen IPSF und OTF bzw. APSF und CTF invertierbar. Die Bildung des Betragsquadrats der APSF ist jedoch ein irreversibler Schritt. Daher können alle Darstellungen nur von der APSF und der CTF aus erreicht werden. Die CTF ist die Darstellung des elektromagnetischen Feldes im Fourierraum. Da dies mit der Beschreibung aus Gleichung (2.11) übereinstimmt, kann das elektrische Feld im Normalraum durch eine Fouriertransformation ermittelt werden. Wird nun in jedem Punkt das Betragsquadrat gebildet ergibt dies die IPSF, welche dadurch lediglich durch reelle Werte beschrieben wird. Durch eine weitere Fouriertransformation kann die OTF berechnet werden. Diese enthält wiederum komplexe Werte, die in Amplitude und Phase zu der MTF und der PTF zerlegt

werden können.

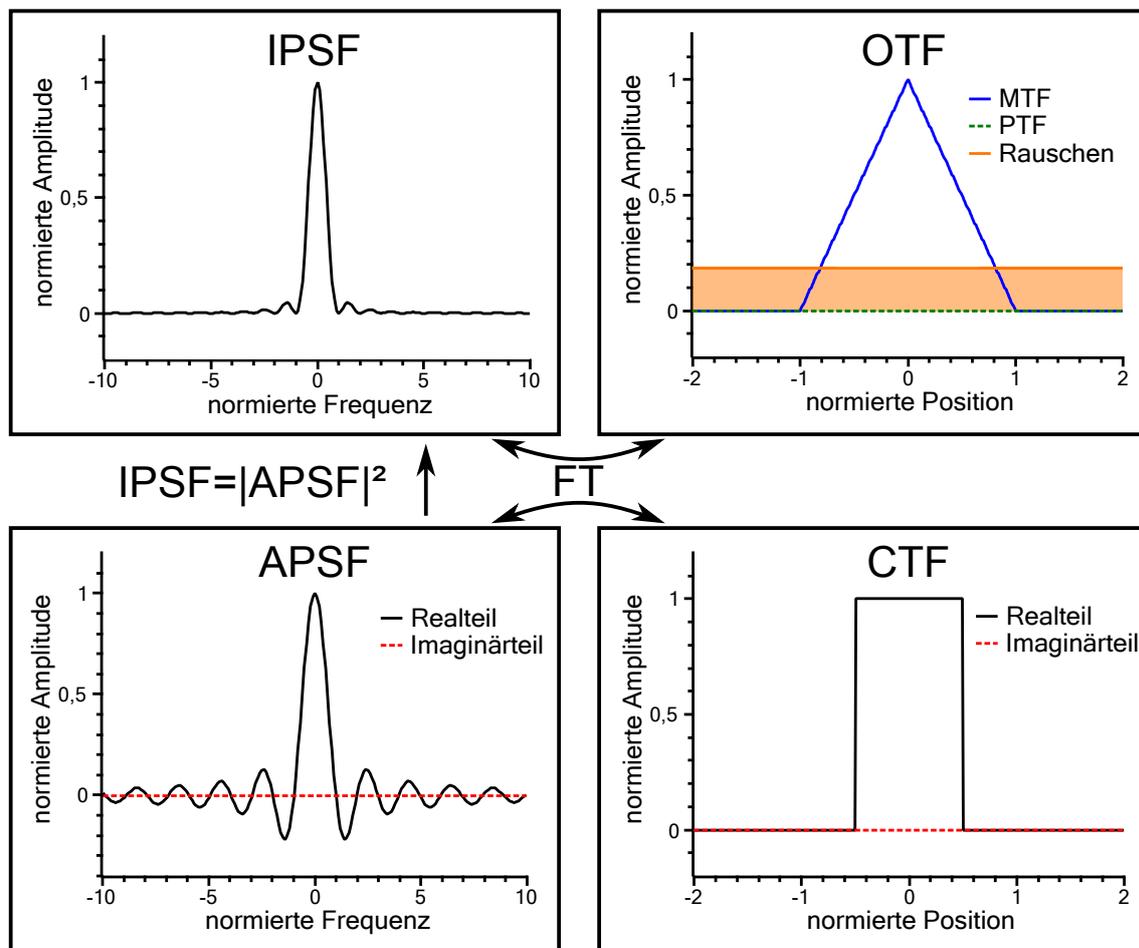


Abbildung 2.4.: Zusammenhänge zwischen Punktspreiz- und Transferfunktionen. CTF: Kohärenztransferfunktion; APSF: Amplituden-Punktspreizfunktion; IPSF: Intensitäts-Punktspreizfunktion; OTF: optische Transferfunktion; MTF: Modulationstransferfunktion; PTF: Phasentransferfunktion; FT: Fouriertransformation

Die - meiner Ansicht nach - zur endgültigen Beurteilung nützlichste Transferfunktion ist die MTF. Sie kann auch direkt durch Beobachtung eines Testobjektes wie einem United States Air Force (USAF) Auflösungstarget (vgl. Abschnitt 4.3.3) gemessen werden [Lor10a], wobei hierfür der Kontrast K in Abhängigkeit der Bildfrequenz ω_B ausgewertet wird:

$$K(\omega) = \frac{I_{\max}(\omega_B) - I_{\min}(\omega_B)}{I_{\max}(\omega_B) + I_{\min}(\omega_B)} \quad (2.39)$$

$I_{\min}(\omega_B)$ entspricht dem Hintergrundlicht und $I_{\max}(\omega_B)$ dem maximal transmittierten Signal. Hierdurch entsteht ein Bezug zwischen der Auflösung und der Empfindlichkeit des Systems. Dies verhindert, beide Größen exakt voneinander zu trennen. Letztendlich besitzt jedes System einen komplizierten Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit und der Auflösung unterschiedlich großer Strukturen. Eine Funktion,

die die Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Strukturgröße darstellt, wird MTF genannt. Üblicherweise wird hierbei auf der horizontalen Achse eine Bildfrequenz ω_B mit dem Kontrast K derselbigen auf der vertikalen Achse verknüpft. Ein "idealisiertes" System würde den maximalen Kontrast bis zur höchsten Bildfrequenz bzw. der vollen Auflösung beibehalten. Dies ist allerdings praktisch nie der Fall. Wird hierzu das Rauschen der Messung eingezeichnet, was bei einem poissonverteilten Schrotrauschen im Frequenzband gleichmäßig verteilt ist [Vas05, VDB83] (weißes Rauschen), wird ersichtlich, dass das Rauschen auch einen direkten Einfluss auf die Auflösung haben kann (Abbildung 2.4). Sinkt der Kontrast unter den Rauschteppich, kann kein Signal mehr gewonnen werden (Abbildung 2.4 OTF). Daher ist die OTF in Diagramm (2.4) aussagekräftiger als die bloßen Kenndaten der Auflösung und Empfindlichkeit. Beide lassen sich direkt aus der MTF ableiten.

Da viele optische Systeme lediglich eine zweidimensionale Abbildung durchführen, genügt eine MTF, die das laterale Verhalten der Optik darstellt. Soll die Aufnahme auch die axialen Eigenschaften der Probe wiedergeben, muss die MTF um diese Dimension ergänzt werden. Hier existieren nun zwei nahezu gleichwertige Möglichkeiten. Zum einen kann die MTF an verschiedenen z-Positionen aufgetragen werden. Diese Darstellung wird sich bei der Bestimmung der Tiefenschärfe in Abschnitt 4.3 als sinnvoll herausstellen. Soll allerdings ein Zusammenhang zwischen Empfindlichkeit und Auflösung in axialer Richtung getroffen werden, kann zum anderen auch die z-Achse im Frequenzraum aufgetragen werden. Hierbei handelt es sich dann um eine dreidimensionale MTF.

2.4.3. Wechselwirkungsmechanismen

Licht ist in der Lage auf viele verschiedene Weisen mit Materie wechselzuwirken, weshalb hier nicht auf alle Mechanismen eingegangen werden kann. Allgemein kann eine Lichtwechselwirkung als Prozess beschrieben werden, der Licht vernichtet, umwandelt oder erzeugt. Hierbei treten in der Mikroskopie drei Mechanismen hervor.

Absorption Die Absorption bzw. Vernichtung von Licht ist vor allem in der optischen Transmissionsmikroskopie von Bedeutung und damit praktisch der erste Kontrastmechanismus, der in der Lichtmikroskopie als Färbetechnik zur Verfügung stand. Neben der Absorption durch natürlich in der Probe enthaltene Farbstoffe wurden einige künstliche Farbstoffe entwickelt, die bereits selektiv einzelne Zellen, Zellwände oder gröbere Strukturen anfärben können [Drö98, Aes10]. Die Selektivität erlaubt es z.B. auch noch heute in histologischen Schnitten, speziell kanzerogene Gewebe zu markieren [Aes10]. Ein Nachteil des Mechanismus besteht darin, dass bei einer schwachen Absorption, die nur wenigen Photonen vernichtet, das Schrotrauschen des Lichts schnell das Signal verbirgt. Weiterhin bleibt der optische Beleuchtungskanal fast ungenutzt, er hat lediglich die Aufgabe, eine homogene Lichtverteilung zu liefern.

Streuung und Brechung Neben dem Verlust von Licht am Objekt kann auch die Richtungsänderung des Lichtes genutzt werden. Dunkelfeldmikroskopie und Auflichtmikroskopie sind hierfür populäre Beispiele [Aes10]. Licht, das nicht abgelenkt wird, wird ausgeblendet und damit auch nicht detektiert. Beleuchtungs- sowie Detektionsweg sind aufeinander abgestimmt und werden bereits effizienter genutzt als dies bei der üblichen Transmissionsmikroskopie der Fall ist. Licht, dass in den Detektionsweg gestreut oder gebrochen wird, kann detektiert werden. Dies ist eine sehr empfindliche Methode, da bereits sehr wenige wechselwirkende Photonen ein Signal erzeugen können. Das Rauschen wird in diesem Fall durch die Intensität des Signals und nicht durch die Intensität der Beleuchtung dominiert. Nahezu jede Materie verursacht Streuung. Daher wird dieser Kontrastmechanismus häufig genutzt, um Messungen an nicht manipulierten Proben durchzuführen. Weitere Beispiele sind in diesem Zusammenhang die Photographie und die optische Kohärenztomographie. Man spricht auch von einem intrinsischen Kontrastmechanismus.

Für spätere Betrachtungen muss noch zwischen zwei Streuprozessen unterschieden werden: Die Mie-Streuung und die Rayleigh-Streuung. Die Mie-Streuung beruht auf einer mikroskopischen Interferenz mehrerer Streuzentren, die eine Kugelform besitzen[Mie08]. Eine statistische Anhäufung von Streuzentren beider Art, mit Abständen nahe und über der Wellenlänge neigt dazu Granulation (im Englischen Speckle) zu verursachen. Je nach Streukörper fallen allerdings auch symmetrische Anordnungen von Streuzentren wie Kugeloberflächen in dieses Regime, die wiederum stark von dem statistischen Verhalten der Granulation abweichen. Werden die Streukörper kleiner als die Wellenlänge, nimmt der Streuquerschnitt schlagartig ab. Dies zählt zum Regime der Rayleigh-Streuung. Der Streuquerschnitt zeigt eine starke Abhängigkeit von der Wellenlänge:

$$\sigma_{\text{Streuung}} \propto \frac{1}{\lambda^4} \quad (2.40)$$

und das Streuverhalten ähnelt immer stärker dem eines elektromagnetischen Dipols [Dem99].

Fluoreszenz Die Fluoreszenz ist ein Spezialfall der Streuung, bei dem das Licht nicht nur in seiner Richtung sondern auch noch in seiner Wellenlänge verändert wird. Die Abgabe des im Normalfall rot verschobenen Lichts erfolgt zeitlich leicht verzögert. Die Verzögerungszeit vieler Farbstoffe liegt in der Größenordnung von einigen wenigen Nanosekunden und kann durch Umgebungseinflüsse weiter variieren [Lak92, Lak06, McG08, McG11]. Ein Vorteil der Fluoreszenz gegenüber der “normalen” Streuung liegt darin, auf Farbstoffen zu basieren. Diese erlauben wie bei der Absorption eine spezifische Anfärbung von Strukturen, die meist biologischer Natur sind. Dennoch bleibt der Vorteil der Empfindlichkeit, wie er bereits bei der Detektion von Streulicht deutlich wurde, erhalten. Die Trennung von Anregungs- und Emissionslicht ist nun noch zusätzlich spektral möglich, was einer verbesserten Abstimmung des Hin- und Rückkanals entspricht. Hierdurch wird ein fehlerbehafteter Hintergrund zusätzlich unterdrückt und das Signal zu Rausch Verhältnis verbessert.

Da die Fluoreszenz einen Spezialfall der Streuung darstellt, erbt diese auch teilweise deren Streucharakteristik. Das Abstrahlverhalten ist wieder äquivalent zu dem eines Dipols, was in Kombination mit der verzögerten Abstrahlung bei einigen Messungen berücksichtigt werden muss [Lak06].

2.4.4. Detektion

Die Detektion des Messsignals wird meist über photoelektrische Wandler erzielt. Mit dem Fortschreiten der Computerentwicklung verdrängte dieser Detektortyp alle chemischen Pendanten.

Photoelektrische Wandler besitzen eine aktive Fläche, die beim Auftreffen eines Photons mit einer detektor- und wellenlängenabhängigen Wahrscheinlichkeit bzw. Quanteneffizienz (QE) ein elektrisches Signal erzeugen. Hierbei gibt es sowohl auf Halbleitern basierende als auch auf dem photoelektrischen Effekt basierende Wandler [Paw06]. Bei einem Halbleiterwandler erzeugen Photonen durch eine Ladungstrennung im Material einen Strom bzw. eine Ladung, wohingegen Photoeffektwandler Elektronen aus einem Metall in ein umgebendes Vakuum abgeben. Diese beiden Effekte sind die gebräuchlichen Techniken, um Licht in elektrische Signale umzusetzen. Darauf folgende elektrische Verstärkungsarten unterscheiden sich lediglich durch spezifische technische Einschränkungen.

Die aktiven Flächen der Wandler können entweder in einer Matrix oder lediglich als einzelne Fläche angeordnet sein. Weiterhin ist die Größe der gesamten aktiven Fläche von Bedeutung, da diese häufig für Beschränkungen z.B. des Sichtfeldes verantwortlich ist. Übliche Matrixdetektoren sind CCD- und CMOS-Sensoren, die über ihre Matrix eine Positionsinformation gewinnen können. Einzeldetektoren werden entweder zur Überwachung eines positionsstabilen Lichtsignals oder in Kombination mit einem abtastenden System auch zur sequenziellen Aufnahme von positionsabhängigen Daten genutzt. Neben der Reaktionszeit der Halbleiterladungstrennung und des photoelektrischen Effekts beschränkt der Sender bzw. die Probe die Rate, mit der ein sequenzielles Signal aufgenommen werden kann. Hier kann ein Matrixdetektor durch seine Parallelisierung zumindest theoretisch höhere Geschwindigkeiten erreichen.

Daraus lässt sich schließen, dass aktive Fläche, Parallelisierung, Quanteneffizienz und die Reaktionszeit des Detektors Eigenschaften sind, die die Systemeigenschaften mitbestimmen. Daher finden sich diese Aspekte in abgewandelter Form auch in Abschnitt 2.5.1 wieder.

2.4.5. Optische Kanäle

Je nach Experiment oder System können und werden mehrere optische Kanäle genutzt, um ein Bild zu erzeugen. Als jeweils ein Kanal gelten in diesem Fall der optische Weg von einem Emitter zum Wechselwirkungsvolumen bzw. der optische Weg vom Wechselwirkungsvolumen zum Detektor. Wichtig ist nun die Feststellung, dass bei Fernfeldsystemen jeder einzelne der Wege den gleichen Beschränkungen unterliegt. Durch die Kombination mehrerer Kanäle können diese Beschränkungen

allerdings reduziert werden.

Der bekannteste Fall ist der verbesserte Kontrast und die verbesserte Auflösung eines konfokalen Mikroskops. Hierbei werden Hin- und Rückkanal gezielt miteinander überlagert und so eine Faltung beider Abbildungseigenschaften genutzt. Als Wechselwirkungsmechanismen können Streuung und Fluoreszenz genutzt werden. “Stimulated Emission Depletion” (STED) Mikroskopie nutzt zwei Hinkanäle und einen Rückkanal, um mit dem speziellen Wechselwirkungsmechanismus der Abregung von angeregten Fluorophoren die Auflösung des Systems um ein Vielfaches zu erhöhen.

2.5. Parameterraum

Die Qualität eines Systems kann auf viele verschiedene Weisen bemessen werden. Hier soll der wissenschaftlichen Nutzen als Qualitätsmerkmal verwendet werden. Dies beinhaltet zwei Folgerungen. Zum einen sind sehr spezielle optische Systeme dadurch berechtigt, dass sie zwar nicht für viele verschiedene Messungen genutzt werden können, aber dennoch einige wenige, wenn nicht sogar lediglich eine wichtige, wissenschaftliche Frage beantworten. Hierunter fallen z.B. Gravitationswelleninterferometer oder Neutrinodetektoren. Zum anderen muss ein System mit einer großen Vielfalt an Messmethoden häufig dem Vergleich mit anderen unter Umständen ähnlichen Systemen standhalten. Dies ist meist nur erfüllbar durch mindestens eine neue zusätzliche Eigenschaft, die andere Systeme bisher nicht geboten haben. Diese Eigenschaft muss nun zwingend einen wissenschaftlichen Nutzen erbringen, um die Systemqualität zu erhöhen.

Die vorigen Abschnitte erlauben eine fundierte Beschreibung optischer Systeme und deren Eigenschaften. Es ist sogar möglich, mit diesem Wissen äußerst effektive Computersimulationen zu entwerfen, was in Kapitel 3 behandelt wird. Diese bekannten Eigenschaften werden im Folgenden genutzt, um einen Parameterraum für optische Fernfeldsysteme abzuleiten. Es wird zwischen Systemeigenschaften und Probeneigenschaften unterschieden, da beides zur Limitierung der eigentlichen Messung beiträgt.

2.5.1. Ableitung der Systemeigenschaften

Da eine beliebige Vielzahl von Parameterscharen in der Lage wäre, die gegebenen Systembedingungen abzubilden, wird hier keine Vollständigkeit gefordert. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass 9 Eigenschaften (8 aus der Lösung der Wellengleichung und einer aus den quantenmechanischen Eigenschaften des Lichtes) notwendig sind, um ein System hinreichend zu beschreiben. Die quantenmechanischen Eigenschaften lassen sich direkt mit der Feldamplitude zu einem Parameter verknüpfen. Zur Sicherung der Vollständigkeit der gewählten Parameter dient wieder die Basis der Wellengleichung $|\tilde{E}_x|, |\tilde{E}_y|, |\tilde{E}_z|, k_x, k_y, k_z, \omega, \tilde{\varphi}_x, \tilde{\varphi}_y, \tilde{\varphi}_z$ bzw. $|E_x|, |E_y|, |E_z|, x, y, z, t, \varphi_x, \varphi_y, \varphi_z$ aus Abschnitt 2.1. Diese werden nun auf Systemparameter abgebildet und müssen alle 8 (bzw. 9) Freiheitsgrade beinhalten.

Auflösung und Sichtfeld ($k_x, k_y, k_z \leftrightarrow x, y, z$) Wie bereits in Abschnitt 2.4.1 klar- gestellt wurde, ist der Detailgrad, den ein optisches System wiedergeben kann, beschränkt. Um diese Beschränkung zu quantifizieren, wird meist die Auflösung Δx des Systems angegeben. Die Auflösung leitet sich von den Wellenvektoren k_x, k_y, k_z ab. Wendet man z.B. das Rayleigh-Kriterium an [Dem99]:

$$\Delta x = \frac{1,22\lambda}{2NA} = \frac{1,22\pi}{kNA} \quad (2.41)$$

erhält man eine Beziehung für die laterale Auflösung in x-Richtung. Die meisten Systeme sind in der xy-Ebene rotationssymmetrisch, weswegen die laterale Auflösung in dieser Ebene für alle Richtungen konstant ist. Daher wird bis auf weiteres lediglich zwischen lateraler und axialer Auflösung unterschieden.

Aus der Invertierbarkeit der Fouriertransformation und deren linearen algebraischen Eigenschaften folgt ein noch strengeres Kriterium für die Bildauflösung, das Abbe Kriterium [Abb80]:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{2\pi}{2kNA} \quad (2.42)$$

Um dies zu verstehen, stelle man sich ein Objekt vor, das die Intensitätsverteilung einer stehenden Welle besitzt und gerade noch aufgelöst werden kann. Um diese Welle abbilden zu können, muss das System bei seinem Detektor wiederum eine stehende Welle erzeugen. Die stehende Welle mit der höchsten Frequenz, die eine Optik noch darstellen kann, besteht aus den beiden am stärksten verkippten Strahlen. Deren projizierte Periode beträgt $2k_x NA$. Zwar existieren kleinere Fokusverteilungen, welche ihre Verkleinerung über die Erhöhung von Seitenbändern erreichen [Boy76, de 03, Liu05, Lor10a], jedoch gilt hier auch die Beschränkung der stehenden Welle. Die Eindeutigkeit der Bildinformation ist unter der Auflösungsgrenze aus Gleichung (2.42) somit nicht gegeben. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass man den hoch aufgelösten Bildinformationen nicht weiter als bis zu der tatsächlichen Auflösungsgrenze in Gleichung (2.42) „trauen“ kann.

Die Auflösung für einen normalen Fokus hängt bei Berücksichtigung der Beziehung $NA = n \sin(\alpha)$ in der Tiefe auch invers proportional vom Brechungsindex ab [Paw06, Lor10a]:

$$\Delta z = \frac{2,12n\lambda}{NA^2} \quad (2.43)$$

Das Äquivalent zum Wellenvektor im Ortsraum ist die Position, an der gemessen wird. Auch diese unterliegt einer Beschränkung durch das optische System. Ein optisches System hat ein festgelegtes Sichtfeld, das zum einen durch die Größe der Optiken und zum anderen physikalisch durch die Apertur der hinteren Fokalebene D_{HFE} beschränkt ist. Hieraus lässt sich die Anzahl M_{\max} der sinnvoll messbaren Bildpunkte in einer Dimension ableiten. Sie stellen ein Maß für die maximale Bildinformation dar:

$$M_{\max} = \frac{\Delta x}{D_{\text{HFE}}} = \frac{\lambda}{2NA D_{\text{HFE}}} \quad (2.44)$$

Die NA bezieht sich in diesem Fall auf die hintere Fokalebene.

Empfindlichkeit ($\text{SNR}_{\text{Poisson}}, |\vec{E}|^2, |\vec{E}|^2$) Die Photonensammeleffizienz eines Systems kann genutzt werden, um dessen Empfindlichkeit zu quantifizieren. Diese Effizienz wird daher von nun an mit der Systemempfindlichkeit gleichgesetzt. Dieser Parameter bewegt sich zwischen 0 %, also einer generellen Unempfindlichkeit gegenüber Photonen, und 100 %, dem Sammeln aller für die Messinformation zur Verfügung stehenden Photonen. Dennoch müssen selbst zwei Systeme mit einer 100 %-igen Sammeleffizienz nicht zwangsläufig die gleiche Messinformationsleistung erbringen. Es ist möglich, dass Photonen zwar gesammelt werden, diese aber keine nutzbare Information besitzen. Ein prominentes Beispiel wäre die Epifluoreszenzmikroskopie, bei der Photonen aus nicht fokussierten Ebenen detektiert werden, die wenig bis gar keine Informationen zum Bild beitragen. Um hier eine Vergleichbarkeit zu schaffen, muss wieder auf das Signal zu Rausch Verhältnis (SNR) zurückgegriffen werden, das von der Photonenstatistik herrührt. Die in Abschnitt 2.2.2 herausgearbeiteten Zusammenhänge zwischen der Statistik eines Lichtfeldes und dessen Intensität können zur besseren Vergleichbarkeit wieder umgekehrt werden. Es gilt $I = \text{SNR}_{\text{Poisson}}^2$ wobei alle folgenden SNR poissonverteilt seien. Wird das nicht nutzbare Hintergrundsignal von der Messung subtrahiert, die Intensität und das Rauschen des neuen Signals bestimmt, und dieses wieder als Poisson-Verteilung gewertetes SNR in eine Intensität überführt, kann eine effektive Systemempfindlichkeit abgeleitet werden (Anhang E).

$$\text{Empfindlichkeit}_{\text{Effektiv}} = \frac{\text{SNR}_{\text{System}}^2 \text{Empfindlichkeit}_{\text{System}}}{\text{SNR}_{\text{Systemhintergrund}}^2 + \text{SNR}_{\text{System}}^2} \quad (2.45)$$

Die effektive Empfindlichkeit ist allerdings von dem System und der Probe abhängig, was den Vergleich nur mit einer auf den Fall angepassten Probenparametrisierung ermöglicht.

Für den Fall einer isotropen Lichtemission von der Probe kann die relative Systemempfindlichkeit von der NA eines einseitigen Systems, dem Brechungsindex n des die Probe umgebenden Mediums und der effektiven Quanteneffizienz (QE) des Detektors abgeleitet werden [Lor11c]:

$$\text{Empfindlichkeit}_{\text{System}} = \frac{\text{QE}_{\text{Detektor}}}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n} \right)^2} \right] \quad (2.46)$$

Hierbei handelt es sich lediglich um eine vom Öffnungswinkel abhängige Größe. Einige Systeme, wie beispielsweise konfokale Mikroskope, schränken zusätzlich den Detektionsort ein. Dies verursacht eine zusätzliche Reduzierung der Empfindlichkeit gegenüber dem emittierten Licht [Hui04].

Geschwindigkeit ($\omega \leftrightarrow t$) Analog zur räumlichen Auflösung wird die Messgeschwindigkeit von der Breite des eingestrahltten oder auch gemessenen Spektrums eingeschränkt. Hierbei spielt auf Grund der meist langsameren Detektoren das eingestrahltte Spektrum die entscheidende Rolle, um besonders schnelle Prozesse zu erfassen. Mit einem im Nahinfraroten arbeitenden fs-Laser können beispielsweise Ereignisse aufgelöst werden, die weniger als 200 fs auseinander liegen [Her02]. Der Aufnahmedauer sind für große Zeitspannen meist keine theoretischen Grenzen gesetzt, jedoch sind kurze Aufnahmedauern zu bevorzugen. Es existieren stets Prozesse, die schneller ablaufen als es die Aufnahmedauer zulässt. Diese werden hierdurch unbeobachtbar. Des Weiteren basieren einige Techniken auf Computerrekonstruktionen, in denen mehrere zeitlich versetzte Messpunkte einen Einfluss auf das Endergebnis besitzen. Hierbei führen Bewegungen oder zeitliche Veränderungen zu Artefakten, die die Informationen unbrauchbar machen können. Als dritte Einschränkung kommt auch die Anzahl der Aufnahmen bei begrenzten finanziellen Mitteln zum tragen. Eine Studie erfordert häufig viele Messungen und einen personellen Aufwand, der bei zu langwierigen oder umständlichen Messungen deren Umsetzung verhindert.

Aberrationen des Systems ($\varphi_x \leftrightarrow \tilde{\varphi}_x$) Aberrationen bezeichnen Differenzen der Phase mehrerer miteinander interferierender Wellen in einem optischen System. Aberrationen werden durch System bzw. durch die Proben bedingte Lichtweglängenunterschiede verursacht [Sch04]. Sie sind meist unerwünscht und wirken sich negativ auf den Kontrast und die Auflösung aus. Allerdings können Aberrationen auch absichtlich mit einem darauf spezialisierten, optischen Element hervorgerufen werden [Sal97b, Tan01, de 03]. Letztendlich bedeutet dies meist einen gezielten Eingriff in die Fokusverteilung. Hierfür werden zum einen mit adaptiven Systemen aktiv die statistischen Aberrationen minimiert [Alb00, Deb07, Han10], zum andern können alternativ oder auch zusätzlich neue durch Linsenoptiken nicht erreichbare Fokusformen erzeugt werden, die von sich aus oder in Kombination mit weiteren Kanälen eine Systemoptimierung bewirken [Hel03]. Die für Experimente relevanten Optimierungsparameter sind auch hier wieder die Auflösung und die Empfindlichkeit. Hierbei ist das Strehlverhältnis \acute{S} [Gu00] ein wichtiger Parameter. Er beschreibt das Verhältnis der Spitzenintensität des normalen Fokus I_{ref} zu der Spitzenintensität des aberrierten Fokus I_{aberr} :

$$\acute{S} = \frac{I_{\text{ref}}}{I_{\text{aberr}}} \quad (2.47)$$

Hierbei werden allerdings Kontrastverluste des Hintergrunds nicht berücksichtigt. Diese können, wie oben beschrieben, über die effektive Systemempfindlichkeit parametrisiert werden.

Polarisation des optischen Kanals ($|\tilde{E}_x|, |\tilde{E}_y|, |\tilde{E}_z|, \tilde{\varphi}_y, \tilde{\varphi}_z \leftrightarrow |E_x|, |E_y|, |E_z|, \varphi_y, \varphi_z$) Um alle Freiheitsgrade aus Gleichung (2.11) zu behandeln, muss nun noch auf die Polarisation des Lichtfeldes eingegangen werden. Die Polarisation hat ähnlich wie die Aberration wieder einen indirekten Einfluss auf die Empfindlichkeit und die Auflösung. Dies gilt vor allen Dingen für Objektive mit einer hohen numerischen

Apertur (NA). Wobei „hoch“ hier das Überschreiten einer NA von 0,5 bedeutet, da dort wie in 2.3.5 erläutert die Polarisation der gebrochenen Welle auch in die beiden orthogonalen Polarisationskanäle übertragen wird [Arn07]. Weiterhin gibt es auf Grund der unterschiedlichen Polarisationsrichtungen noch die Möglichkeit der zirkularen oder elliptischen Polarisation des Lichtes, was sich durch Phasenunterschiede zwischen den einzelnen Polarisationsrichtungen ausdrückt [Dem99].

2.5.2. Ableitung der Probeneigenschaften

Das Lichtfeld zwischen System und Probe bzw. Objekt ist der Kommunikationskanal, über den die Probe untersucht werden kann. Daher muss für die Durchführbarkeit eines optischen Versuchs das Objekt möglichst viele Information aus beziehungsweise in den optischen Kanal übertragen werden. Somit gilt genau wie für das optische System, dass wiederum mindestens 8 (bzw. 9) Parameter betrachtet werden müssen, um eine vollständige Beschreibung zu ermöglichen. Das Feld selbst enthält allerdings keine explizite Information über dessen Entstehungsmechanismus. Dies erfordert die Einführung eines weiteren Parameters, den Wechselwirkungsmechanismus. Ohne diesen wäre keine Messung möglich.

Ein konkreter Versuch wird stets durch die Verknüpfung der Proben- mit den Systemeigenschaften ermöglicht oder verhindert, so dass die Basis der Wellengleichung $|\tilde{E}_x|, |\tilde{E}_y|, |\tilde{E}_z|, k_x, k_y, k_z, \omega, \tilde{\varphi}_x, \tilde{\varphi}_y, \tilde{\varphi}_z$ bzw. $|E_x|, |E_y|, |E_z|, x, y, z, t, \varphi_x, \varphi_y, \varphi_z$ auch auf Eigenschaften der Probe übertragen werden müssen.

Hintergrund (Kontrastmechanismen) Die drei Kontrastmechanismen Absorption, Streuung und Fluoreszenz wurden bereits in Abschnitt 2.4.3 ausführlich erläutert. Auch die im Folgenden abgeleiteten Probeneigenschaften können zur Kontrastgebung beitragen. Allgemein kann jedoch festgehalten werden, dass eine Kontrastierung, die spezifisch das gewünschte Gebilde darstellt, auch mehr Bildinformationen liefert. Die Signalentstehung geht immer einher damit, dass anregendes Licht aus dem genutzten Anregungskanal in einen Detektionskanal konvertiert wird. Diese Konvertierung beeinflusst das Anregungslicht. Des Weiteren kann auch das Licht des Detektionskanals wiederum durch ein Wechselwirkungsereignis in einen weiteren nicht detektierten oder minderwertigen optischen Kanal transferiert werden. Außerhalb des Objektes kann davon ausgegangen werden, dass die Kanäle nicht mehr miteinander „kommunizieren“.

Dieser Sachverhalt kann z.B. an einem streuenden Objekt verdeutlicht werden. Je mehr Licht gestreut wird, desto stärker wird das Streusignal. Wird Licht allerdings mehrmals gestreut, geht dies mit einem Informationsverlust der ersten Streuung einher. Um so öfter ein Photon gestreut wird, desto stärker wird der so generierte Streuhintergrund bis hin zur Vernichtung der Ursprungsinformation [Wan02].

Es wird deutlich, dass nicht alle Kontrastmechanismen für alle Arten von Proben geeignet sind. Daher muss wieder auf die effektiv nutzbare Empfindlichkeit zurückgegriffen werden, die nun auch den Hintergrund des Objekts berücksichtigen muss (Anhang E):

$$\text{Empfindlichkeit}_{\text{Effektiv}} = \frac{\text{SNR}_{\text{System}}^2 \text{Empfindlichkeit}_{\text{System}}}{\text{SNR}_{\text{Objekt-}\&\text{Systemhintergrund}}^2 + \text{SNR}_{\text{System}}^2} \quad (2.48)$$

Maximale Anzahl nutzbarer Photonen ($\text{SNR}_{\text{Poisson}}, |\vec{E}|^2, |\vec{E}|^2$) Genau wie für die Empfindlichkeit des Systems gilt, dass eine größere Anzahl an Photonen, die von der Probe emittiert werden, einen Informationsgewinn bedeutet. Häufig hat das System die Möglichkeit, auch auf die Photonenintensität der Probe Einfluss zu nehmen. Hierbei ergeben sich allerdings Begrenzungen durch die Probe selbst, so dass die Anregungsintensität nahezu ausnahmslos nicht durch das optische System begrenzt wird.

Tendenziell lassen sich einige Parameter ableiten, die eine beliebig lange oder intensive Bestrahlung verhindern. Hierzu zählen Bewegungen der Probe [Bir10], die genutzten Wellenlängen [Wag10], die Temperatur [Paw06] oder ungewollte nichtlineare Wechselwirkungsmechanismen höherer Ordnungen [Kal11]. Die Kombination einer Vielzahl dieser Parameter führt stets zu einer relevanten Messgröße: Die maximale Anzahl Q_{max} emittierter Photonen, bevor die Probe nicht mehr genutzt werden kann. Durch die Kombination mit der effektiven Empfindlichkeit, lässt sich die Anzahl der maximal nutzbaren Photonen Q_{Nutzbar} ermitteln:

$$Q_{\text{Nutzbar}} = Q_{\text{max}} \text{Empfindlichkeit}_{\text{Effektiv}} \quad (2.49)$$

Polarisationseffekte in der Probe ($|\tilde{E}_x|, |\tilde{E}_y|, |\tilde{E}_z|, \tilde{\varphi}_y, \tilde{\varphi}_z \leftrightarrow |E_x|, |E_y|, |E_z|, \varphi_y, \varphi_z$)

Die Polarisation des Lichtes kann auf viele verschiedene Weisen Auswirkungen auf das Messergebnis haben. Beginnend mit dem einfallenden Licht, das bereits x-, y- und z-Komponenten im E-Feld aufweist, können diese Komponenten zusätzlich linear, elliptisch, zirkular oder auch ohne Polarisation sein. In Abhängigkeit von den Wechselwirkungs- bzw. Kontrastmechanismen regen diese Lichtfelder bessere, schlechtere oder in speziellen Fällen gar keine Signale an. Um einen Einblick in dieses Verhalten zu gewinnen, kann der Dipolcharakter von Farb- und Streuzentren sowie die Doppelbrechung betrachtet werden. Farb- und Streuzentren sind in guter Näherung Dipole, die dementsprechend als elektromagnetischer Dipol absorbieren und reemittieren [Dem99, Lak06]. Dipolstrahlung ist charakteristischerweise linear polarisiert, wird also in einem linearen Polarisationskanal keinerlei Anregung oder Emission aufweisen [Dem99]. Eine häufige Ausnahme bildet sich bei mobilen Dipolen, was genutzt wird, um deren Beweglichkeit zu analysieren [Lak06]. Bei doppelbrechenden Proben werden die hierdurch auftretenden Laufzeitunterschiede zwischen den unterschiedlichen Polarisationskanälen genutzt um ein Signal zu erzeugen [Dem99, Aes10].

Spektrum und Verzögerung ($\omega \leftrightarrow t$) Praktisch jeder Kontrastmechanismus, mit dem ein Objekt untersucht wird, zeigt in irgendeiner Art und Weise eine spektrale Abhängigkeit. Daher gilt der spektralen Aufschlüsselung von Lichtsignalen eine große

Aufmerksamkeit. Zunächst sind die Kontrastmechanismen der Streuung und der Absorption zu nennen, da diese dominant darauf Einfluss üben, ob Licht das Objekt überhaupt passieren kann. Ist die Absorption zu hoch, wird alles Licht in nicht detektierbare Energieformen konvertiert. Ist die Streuung zu stark, gehen sämtlich Bildinformationen verloren. Ein Wellenlängenbereich, in dem diese Einschränkungen ein lokales Minimum zeigen, wird meist als “optisches Fenster” bezeichnet [Kön00]. Kann das optische System diese Fenster bedienen, besteht z.B. durch die Nutzung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe die Möglichkeit der Reemission von Licht in andere spektrale Kanäle sowie in zeitverzögerte Kanäle.

Hierbei sind die Farbstoffe selbst nicht beliebig schmalbandig und reagieren nicht beliebig schnell. Dennoch besitzt auch das Licht dahingehende Einschränkungen, die bei der Streuung zu einer zeitlichen Beschränkung führen. Der Zusammenhang zwischen der so genannten Kohärenzzeit $\tau_{\text{kohärenz}}$ und der spektralen Breite $\Delta\nu$ ist gegeben durch [Dem99]:

$$\tau_{\text{kohärenz}} \approx \frac{1}{\Delta\nu} \quad (2.50)$$

und kann daher von keinem Kontrastmechanismus unterschritten werden.

Aberrationen durch die Probe ($\varphi_x \leftrightarrow \tilde{\varphi}_x$) Häufig variiert die Brechungsindexverteilung der Probe so stark, dass die Näherung eines homogenen Ausbreitungsmediums nicht mehr gültig ist. Es treten Lichtwegverzögerungen auf, die zu Phasenfehlern am eigentlichen Fokuspunkt führen. Sind diese Phasenfehler bekannt, kann das Lichtfeld komplementär vorgeformt werden und in diesem Punkt eine scharfe Abbildung erfolgen [Sch04]. Ist dies nicht der Fall, kann analog zu Streuungsverlusten eine positionsabhängige Auflösung und Empfindlichkeit abgeleitet werden.

Größe und Detektionsrichtung ($k_x, k_y, k_z \leftrightarrow x, y, z$) Neben den Informationen, die von einer Probe gewonnen werden können, müssen zusätzlich deren Randbedingungen berücksichtigt werden. Die Ausdehnung der Probe kann ein optisches System überfordern, da sie nicht mehr in das messbare Volumen passt. Weiterhin skalieren die Gesamtabsorption und Streuung mit der Messtiefe und damit auch das diagnostische Fenster. Die Anforderungen an große Proben sind daher generell höher als an kleine. Kann das Licht nicht mehr die gesamte Probe durchdringen, ist es auch von Bedeutung, aus welcher Richtung und mit welchem Raumwinkel die optischen Kanäle arbeiten. Es kann zu Abschattungseffekten kommen, die die Detektion von Informationen verhindern. In erster Näherung kann hier das Lambert-Beersche Gesetz angesetzt werden, das mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ eine tiefenabhängige Skalierung des Signals $I(z)$ erlaubt.

$$I(z) = I_0 e^{-\epsilon z} \quad (2.51)$$

$$\text{SNR}(z) = \text{SNR}_0 e^{-\epsilon z/2} \quad (2.52)$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ kann daher wieder so normiert werden, dass das effektive Nutzsignal berechnet wird.

2.5.3. Nichtlineare Systeme

In den letzten Jahren wurden mehrere Fernfeldmikroskopiesysteme entwickelt, die durch nichtlineare Effekte in der Lage sind, die in Abschnitt 2.5 theoretisch festgestellte maximale Auflösung zu unterschreiten. Nichtlinear bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Messsignal nicht linear mit der eingestrahnten Intensität zusammenhängt. Um die Gültigkeit der Auflösungsgrenze zu untermauern, werden hier drei dieser Techniken exemplarisch behandelt und der vermeintliche Widerspruch erklärt.

Vorweg sei angemerkt, dass stets eine Annahme getroffen werden muss, die ein spezielles Emissionsverhalten der Probe voraussetzt, das auf nicht linearem Wege mit der Beleuchtung provoziert wird. So kann die Auflösung auf eine bedeutend genauere Positionsbestimmung zurückgeführt werden. Keines dieser Prinzipien kann angewandt werden, wenn das Objekt unbekannt und nicht kontrolliert beleuchtet wird. Daher sind all diese Verfahren praktisch ungeeignet, um die Auflösungsbegrenzung z.B. bei astronomischen Teleskopen zu unterschreiten.

Multiphotonenmikroskopie Bei der Multiphotonenmikroskopie handelt es sich um laserscannende Fluoreszenzmikroskopie, die die Bildinformation aus dem Wissen über die Fokusposition gewinnt [Zip03]. Als Lichtquelle wird ein Ultrakurzpulslaser im infraroten Wellenlängenbereich eingesetzt. Die kurzen Pulse ermöglichen eine hohe Photonendichte, die nötig ist, um die Energie mindestens zweier Photonen gleichzeitig zur Anregung eines Fluoreszenzvorgangs einzusetzen [GM31, Zip03]. Auf Grund dieser Energieverdopplung können Fluorophore bei der halben Wellenlänge des Laserlichts angeregt werden. Im Rückkanal wird praktisch keine Auflösungsinformation gewonnen und das Licht auf eine Photomultiplier Tube (PMT) abgebildet. Es ist ersichtlich, dass die Auflösung, die mit dem infraroten Licht erzielt werden sollte, maximal bei der halben Wellenlänge liegt. Jedoch lassen sich Details bis hin zu einem Viertel der Wellenlänge detektieren. Dies liegt an dem nicht linearen Ansprechverhalten der Probe auf das Lichtfeld und der geringen Komplexität des Fokus. Es ist zudem nicht möglich, mehr Information auf dem Hinkanal zu übertragen, als es die klassische Auflösungsgrenze zulässt. Setzt man jedoch voraus, dass mit dem Hinkanal ein einfacher Fokus übertragen wird, kann durch das Verhalten der Probe diese einfache Intensitätsverteilung in eine genauere Anregungsfunktion umgeformt werden, welche letztendlich für die Auflösung verantwortlich ist. Die Positionsinformation ist in der verkippten Phase in der hinteren Fokalebene des Objektivs kodiert und kann nahezu beliebig genau ermittelt werden.

Um den Unterschied einer Auflösungssteigerung des optischen Systems gegenüber der Auflösungssteigerung vor Ort in der Probe zu verdeutlichen, kann auch ein Doppelfokus angenommen werden. Nähert man zwei benachbarte Fokuse einander immer weiter an bis sie verschmelzen, stellt man fest, dass auf diese Weise die

Auflösungserhöhung nicht mehr erzielt werden kann. Die beiden simultan anregenden Fokusse erreichen lediglich ihre klassische Auflösungsgrenze. Das Lichtfeld ist nicht in der Lage ein derart detaillierte Struktur darzustellen.

Stimulated Emission Depletion (STED) Bei der STED Mikroskopie wird, ähnlich wie bei der Multiphotonenmikroskopie, die nichtlineare Reaktion von Fluorophoren auf ein weniger detailliertes Lichtfeld genutzt [Wei00, Hel03]. Ein beugungsbegrenzter Anregungsfokus hebt mit einem kurzen Puls die Fluorophore in einen angeregten Zustand, den sie wenige Nanosekunden später wieder unter der Emission von Fluoreszenz verlassen würden. Nun wird ein zweiter, donutförmiger Fokus in einem kurz darauf folgenden sehr intensiven Puls auf dieselbe Stelle fokussiert. Durch die hohe Intensität werden praktisch alle Fluorophore stimuliert abgeregt. Lediglich die Fluorophore, die sich nahe genug an der Nullstelle des Donutfokus befinden, verbleiben in einem angeregten Zustand und können daraufhin detektierbare Photonen emittieren. Hier gilt wie zuvor, dass weder der normale noch der Donutfokus eine kleinere Struktur als die der Auflösungsgrenze besitzen. Lediglich die Reaktion der Probe auf die Form und Intensität des Lichtfeldes erzeugt lokal eine hochauflösende Anregung, die wieder über die verkippte Phase der hinteren Fokalebene des Objektivs einer exakten Position zugeordnet werden kann.

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) STORM und eine Vielzahl ähnlicher Mikroskopietechniken unterscheiden sich von den beiden vorherigen Verfahren auf den ersten Blick durch die Verwendung einer Kamera statt eines Laserscanners [Rus06, Bet06]. Das Bestrahlen der Probe mit einem extrem intensiven Lichtfeld regt über Photoschalten oder Photobleichen fast alle Fluorophore in nicht strahlende Zustände an. Lediglich einige wenige verbleiben in einem fluoreszierenden Zustand. Dies erlaubt die Annahme, dass eine Folge von Photonen, die vom gleichen Punkt stammen von demselben Fluorophor emittiert wurden. Nach einer durch den Farbstoff und die Bestrahlungsstärke vorgegebenen Zeit gehen auch diese Farbstoffmoleküle in einen nicht strahlenden Zustand über. Einige andere kehren aus diesem zurück und die Messung kann erneut stattfinden. Hierbei wird schon klar, dass das System den Fluorophor gar nicht besser auflösen kann. Lediglich durch die temporäre und hoch nicht lineare Manipulation der Fluorophore darf die Annahme der Einzelbeobachtung getroffen werden. Nun ist es möglich, im Gegensatz zu dem in Abschnitt 2.2.1 geschilderten Normalfall, N Photonen einem Fluorophor zuzuordnen. Durch eine Schwerpunktbildung, lässt sich auf die verkippte Phase des Lichtfeldes in der hinteren Fokalebene zurückschließen. Die Genauigkeit der Schwerpunktbildung skaliert hierbei mit:

$$\Delta x_{\text{STORM}} = \frac{\Delta x}{\sqrt{Q}} = \frac{\lambda}{2\text{NA}\sqrt{Q}}, \quad (2.53)$$

was bei 900 detektiertem Photonen einer Verdreißigfachung der Auflösung entspricht.

2.5.4. Zusammenfassung der Parameter

Bei der Betrachtung des Abschnitts 2.5 kristallisieren sich drei relevante Parameter heraus, die die Bewertung eines optischen System ermöglichen. Neben der räumlichen und zeitlichen Auflösung sowie der Empfindlichkeit kann sich ein System durch eine Vielzahl an optischen Kanälen auszeichnen. Um so feiner und vollständiger das Lichtfeld ausgewertet und beeinflusst wird, desto mehr Informationen stehen für ein Experiment zur Verfügung. Dieser Trend nennt sich multidimensionale Bildgebung [And02], die für jeden zusätzlichen Freiheitsgrad der Lösung (2.11) eine weitere Dimension hinzufügen kann. Um diesen Trend fortzusetzen, müssen weitere Kanäle genutzt werden, die entweder nicht auf elektromagnetischen Fernfeldern basieren oder gar einen anderen Energie- bzw. Informationsträger nutzen. Ein Beispiel ist hier die Optoakustik, die als Informationsträger akustische Wellen statt Licht benutzt.

3. Numerische Beschreibung der Fernfeldoptik

Das vorherige Kapitel befasste sich mit den grundlegenden Aspekten von Licht in homogenen ungeladenen Nichtleitern und deren Konsequenzen für optische Systeme. Die allgemeine Betrachtung der Lichtfelder auf Basis dieses mathematischen Modells erlaubt nicht nur die analytische Beschreibung der Lichtfelder. Es ist auch möglich, effiziente numerische Umsetzungen zu formulieren, die in komplexen Fällen das Verständnis und die Analyse stark vereinfachen. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den hierfür notwendigen Formulierungen und zeigt anhand einiger auch in den folgenden Kapitel wiederkehrender Beispiele die Flexibilität dieses Ansatzes.

Inhalt

3.1. Fourierraum und FFT	36
3.1.1. Die diskrete Fouriertransformation (DFT)	36
3.1.2. Eigenschaften der FFT	36
3.2. Fokussimulation	39
3.2.1. 3d-Fokus	40
3.2.2. 4d-Fokus (Zeitliche Propagation)	41
3.2.3. (De-)Polarisation	41
3.3. Dimensionsreduktion	42
3.3.1. 2d-Raum	42
3.3.2. 2d-Raum zuzüglich zeitlicher Propagation	43
3.4. Interpolation	43
3.4.1. Raster und Fehler	43
3.4.2. Nächster-Nachbar-Interpolation	46
3.4.3. Lineare-Interpolation	47
3.4.4. B-Spline-Interpolation	47
3.4.5. Sinc-Interpolation	48
3.4.6. Gefensterte sinc-Interpolation	49
3.4.7. Skalierte sinc-Interpolation	51
3.5. Simulationen und erhöhte Tiefenschärfe	51
3.5.1. Aberrationen	52
3.5.2. Besselstrahl & fs-Besselstrahl	53
3.5.3. Stufenlinse	54
3.5.4. Spektraler Besselstrahl mit fs-Laser	55
3.5.5. Intrinsischer fs-Scanner	56
3.6. Diskussion	57

3.1. Fourierraum und FFT

Gleichung (2.11) zeigt, dass bei der Kenntnis des zu untersuchenden Lichtfeldes im Fourierraum dieses Feld mittels einer Fouriertransformation in den Normalraum übertragen werden kann. Auch in Abschnitt 2.4.2 wird deutlich, dass die CTF über eine Fouriertransformation mit der APSF zusammenhängt. Für numerische Probleme muss auf die diskrete Fouriertransformation (DFT) zurückgegriffen werden.

3.1.1. Die diskrete Fouriertransformation (DFT)

Ist die Nutzung einer DFT für eine Problemstellung möglich, bietet es sich an auf eine schnelle bzw. “Fast Fourier Transformation” (FFT) zurückzugreifen. Ein Beispiel für einen FFT-Algorithmus ist in den “Numerical Recipes” zu finden [Pre92b]. Generell stellt eine FFT eine spezielle Zerlegungsform einer äquidistanten und periodischen diskreten Fouriertransformation (DFT) dar. Diese kann mit weniger Rechenoperationen und damit schneller als die DFT durchgeführt werden. Die Ergebnisse beider Verfahren sind identisch, weshalb hier lediglich die DFT als mathematische Grundlage gezeigt wird:

$$\text{DFT}(\vec{a})_k = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{j=0}^{N-1} a_j e^{-2\pi i \frac{jk}{N}} \quad (3.1)$$

Die DFT stellt eine Übertragung der Integralform der Fouriertransformation in eine durch $\frac{1}{\sqrt{N}}$ normierte Summenform derselbigen dar. N beschreibt hierbei die Anzahl der äquidistanten Stütz- oder auch Messpunkte und j, k die Position eines konkreten Wertes.

Wie in den folgenden Abschnitten verdeutlicht wird, fallen die von einer Lichtwelle bekannten Frequenzen meist nicht auf die äquidistanten Stützpunkte. Hierfür gibt es zwei Lösungsansätze. Der Erste, der auf Grund der Rechenintensität verworfen wurde, ist die Umwandlung der äquidistanten DFT in eine allgemeine DFT:

$$\text{DFT}_{\text{Allgemein}}(\vec{a})_k = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{j=0}^{N-1} a_j e^{-2\pi i \varphi_j k} \quad (3.2)$$

Hierbei wird ein positionsabhängiger Phasenfaktor φ_j eingeführt, der den äquidistanten Term $\frac{j}{N}$ ersetzt. Dieses Prinzip lässt sich nicht auf die FFT übertragen. Alternativ lässt sich mit einer geeigneten Interpolationsmethode eine nahezu exakte Repräsentation der allgemeinen DFT durch eine gewöhnliche äquidistante Darstellung erzeugen. Dieser Ansatz wird in Abschnitt 3.4 weiterverfolgt. Sobald dies Voraussetzungen für eine korrekte Representation erfüllt werden, können die analytischen Modelle aus Kapitel 2 auf numerische Modelle übertragen werden.

3.1.2. Eigenschaften der FFT

Der Unterschied zwischen der Simulation und einem analytischen Modell zeigt sich am deutlichsten in der Beschränkung des simulierten Volumens. Da das Ergebnis

unbekannt ist, muss für jede Stützstelle ein Wert gespeichert werden. Daher ist die Größe des Arbeitsspeichers, in dem die Daten vorhanden sein müssen, um eine FFT schnell genug umzusetzen, ein limitierender Faktor. Dies verursacht eine a priori Beschränkung sowohl des Spektrums als auch des Fokusvolumens. Um die Auswirkungen und die Umsetzung genauer zu erläutern ist es nötig, einige Skalierungsfaktoren herzuleiten. Beginnend mit der Übertragung von Gleichung (2.28) auf eine numerisierbare DFT [Mer10]:

$$E(x, t = 0) = \int_{-\infty}^{\infty} dk \tilde{E}(\vec{k}) e^{i\vec{k}\vec{r}} \quad (3.3)$$

Zunächst ist es nicht möglich, eine unbeschränkte Integration durchzuführen. Daher wird das Spektrum zwischen $\vec{k} = (\overline{k_x}, \overline{k_y}, \overline{k_z})$ und $\underline{k} = (\underline{k_x}, \underline{k_y}, \underline{k_z})$ eingeschränkt. Verschwindet $\tilde{E}(\vec{k})$ außerhalb der Integrationsgrenzen, ist das Ergebnis identisch zu dem bei einer Integration mit unendlichen Grenzen. Diese Bedingung kann, wie in den folgenden Abschnitten erläutert wird, ohne Beschränkung der Allgemeinheit gefordert werden. Außerdem ist es nicht möglich, unendlich viele Stützstellen zuzulassen. Daher wird das Signal an endlich vielen äquidistante Positionen abgetastet. Die Abtastung kann durch eine Multiplikation von $\tilde{E}(\vec{k})$ mit einer Abtastfunktion $T_{jkl}(\vec{k})$ - einem Dirac-Kamm - analytisch beschrieben werden.

$$T_{jkl}(\vec{k}) = \left(\sum_{j=0}^{N-1} \delta(k_x - j \frac{\Delta k_N}{N} - \underline{k_x}) \right) \cdot \left(\sum_{k=0}^{M-1} \delta(k_y - k \frac{\Delta k_M}{M} - \underline{k_y}) \right) \cdot \left(\sum_{l=0}^{O-1} \delta(k_z - l \frac{\Delta k_O}{O} - \underline{k_z}) \right) \quad (3.4)$$

$$E_{neu}(\vec{r}, t = 0) = E_{neu}(\vec{r}) = \int_{\underline{k}}^{\overline{k}} dk \tilde{E}(\vec{k}) e^{i\vec{k}\vec{r}} T_{jkl}(\vec{k}) \quad (3.5)$$

$$= \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{O-1} \tilde{E}(\vec{k}_{j,k,l}) e^{i(\vec{k}_{j,k,l} + \underline{k})\vec{r}} \quad (3.6)$$

$\Delta k_N = \overline{k_x} - \underline{k_x}$, $\Delta k_M = \overline{k_y} - \underline{k_y}$, $\Delta k_O = \overline{k_z} - \underline{k_z}$ und $\vec{k}_{j,k,l} = (j \frac{\Delta k_N}{N}, k \frac{\Delta k_M}{M}, l \frac{\Delta k_O}{O})$ wurden hier zur Verkürzung der Schreibweise eingeführt. Man beachte, dass auf diese Weise die analytische Fouriertransformation in eine DFT überführt wird.

Die Multiplikation der Abtastfunktion $T_{jkl}(\vec{k})$ mit dem Signal $\tilde{E}(\vec{k})$ und der darauffolgenden Fouriertransformation ist identisch mit der Faltung der Fouriertransformierten beider Multiplikatoren. So kann eine Beziehung zwischen den Ergebnissen der analytischen Fouriertransformation und der DFT hergestellt werden:

$$E_{neu}(\vec{r}) = E(\vec{r}) \otimes \text{FT}(T_{jkl}(\vec{k})) \quad (3.7)$$

Die Einschränkungen, die durch die Abtastung mit $T_{jkl}(\vec{k})$ gegenüber der analytischen Lösung auftreten, sind daher alle anhand von $\text{FT}(T_{jkl}(\vec{k}))$ beschreibbar [Mer10]. Hierfür ist es einfacher, eine alternative Beschreibung zu wählen. Des Weiteren wird

der Sachverhalt exemplarisch für eine Dimension dargestellt:

$$T_j(k_x) = \left(\sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta(k_x - j \frac{\Delta k_N}{N} - \underline{k_x}) \right) \square \left(\frac{k_x - \underline{k_x}}{\Delta k_N} - \frac{1}{2} \right) \quad (3.8)$$

$\square(x)$ ist die sogenannte Rechteckfunktion (vgl. 2.3.3). Zur Vereinfachung sei $\underline{k_x}$ so gewählt, dass es einem Vielfachen von Δk_N entspricht. Es folgt:

$$T_j(k_x) = \left(\sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta(k_x - j \frac{\Delta k_N}{N}) \right) \square \left(\frac{k_x - \underline{k_x}}{\Delta k_N} - \frac{1}{2} \right) \quad (3.9)$$

Hierbei handelt es sich um die Multiplikation zweier Funktionen, deren Multiplikation nach der Fouriertransformation wiederum durch die Faltung der transformierten Produkte dargestellt werden kann:

$$\text{FT}(T_j(k_x)) = \text{FT} \left(\sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta(k_x - j \frac{\Delta k_N}{N}) \right) \otimes \text{FT} \left(\square \left(\frac{k_x - \underline{k_x}}{\Delta k_N} - \frac{1}{2} \right) \right) \quad (3.10)$$

Die Fouriertransformation¹ des Dirac-Kammes ist wiederum ein Dirac-Kamm. Die Fouriertransformation der Rechteckfunktion $\square(x)$ ist die sogenannte sinc-Funktion [Mer10]:

$$\text{FT} \left(\sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta(k_x - j \frac{\Delta k_N}{N}) \right) = \Delta r_N \sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta(r_x - j \Delta r_N) \quad (3.11)$$

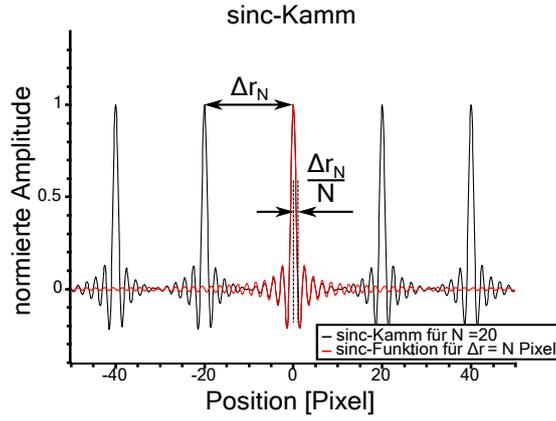
$$\text{FT} \left(\square \left(\frac{k_x - \underline{k_x}}{\Delta k_N} - \frac{1}{2} \right) \right) = \frac{1}{\Delta k_N} \text{sinc} \left(\frac{r_x \Delta k_N}{2\pi} \right) e^{i \widehat{k_x} r_x} \quad (3.12)$$

Mit $\Delta r_N = \frac{2\pi N}{\Delta k_N}$ [Mer10]. Hierbei gilt $\widehat{k_x} = \frac{\overline{k_x + k_x}}{2}$. Der Phasenterm $e^{i \widehat{k_x} r_x}$ ist bei symmetrischen Spektralbereichen konstant 1. Da dieser für die weitere Betrachtung irrelevant ist und dessen Einbeziehen analog verläuft, wird nun von einer symmetrischen Frequenzverteilung ausgegangen ($\overline{k_x} = -\underline{k_x}$).

$$\text{FT} \left(\square \left(\frac{k_x - \underline{k_x}}{\Delta k_N} - \frac{1}{2} \right) \right) = \frac{1}{\Delta k_N} \text{sinc} \left(\frac{r_x N}{\Delta r_N} \right) \quad (3.13)$$

Wird diese Funktion nun mit dem Dirac-Kamm gefaltet, ergibt sich ein sinc-Kamm, bei dem im Abstand von jeweils Δr_N eine neue sinc-Funktion hinzugefügt wird:

¹ $\text{FT}(f(k)) = \int_{-\infty}^{\infty} dk f(k) e^{-ikx}$

Abbildung 3.1.: sinc-Kamm für $\frac{\Delta r_N}{N} = 20$ Pixel

$$FT(T_{jkl}(k_x)) = \Delta r_N \sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta(r_x - j\Delta r_N) \otimes \frac{1}{\Delta k_N} \text{sinc}\left(\frac{r_x N}{\Delta r_N}\right) \quad (3.14)$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} dr \left(\Delta r_N \sum_{j=-\infty}^{\infty} \delta((r_x - j\Delta r_N) - r) \right) \left(\frac{1}{\Delta k_N} \text{sinc}\left(\frac{r N}{\Delta r_N}\right) \right) \quad (3.15)$$

$$= \frac{\Delta r_N}{\Delta k_N} \sum_{j=-\infty}^{\infty} \text{sinc}\left(\frac{(r_x - j\Delta r_N) N}{\Delta r_N}\right) \quad (3.16)$$

Da eine sinc-Funktion für $r_x = 0$ eins ergibt und für alle ganzzahligen Argumente null ist, trägt diese Funktion nur zu der zentralen Stützstelle bei und verschwindet bei allen N äquidistanten Stützstellen bis zum nächsten Deltapuls des Dirac-Kammes (Abbildung 3.1). Somit stimmen die Werte an den Stützstellen mit der analytischen Lösung überein. Als Skalierungsgrößen ergeben sich somit Δk_N als die Breite des Spektrums, $\Delta k_N/N$ als der Abstand zwischen zwei benachbarten Stützstellen, Δr_N als die Periode, mit der der Ortsraum wiederholt wird (vgl. Abbildung 3.1) und $\Delta r_N/N$ als der Abstand benachbarter Stützstellen im Ortsraum. Mit der Verknüpfung $\Delta r_N = \frac{2\pi N}{\Delta k_N}$ können all diese Größen bei Kenntnis von N ineinander überführt werden.

3.2. Fokussimulation

Für viele Systemanalysen ist der in der Probe liegende optische Fokus von zentralem Interesse, da dieser bei der Faltung die Gewichtungsfunktion darstellt (vgl. Abschnitt 2.4.1). Um diesen zu bestimmen, ist es möglich, wie es in 2.4.2 gefolgert wird, mit der Bestimmung der CTF zu beginnen. Im Folgenden wird erläutert, wie die CTF und deren Verarbeitung bei einer numerischen Basis erfolgt. Es wird davon ausgegangen, dass eine hinreichend gute Interpolationsmethode zur Verfügung steht, um fehlerfreie Ergebnisse zu erzielen.

3.2.1. 3d-Fokus

In Abschnitt 2.3.2 wurde bereits erläutert, dass z.B. mit der Sinusbedingung [Gu00] die Abbildung des Lichtfeldes aus der hinteren Fokalebene auf die CTF ermittelt werden kann. Bei einer kohärenten Lichtquelle wie einem Laser wird hierzu jeder Punkt mit Phase und Amplitude an die in drei Dimensionen durch eine Kugeloberfläche beschränkte Position gesetzt.

Mit den Skalierungsfaktoren und der Abtastung aus Abschnitt 3.1.2 lässt sich die analytische Form der CTF in die numerische übertragen.

Zu dieser Reskalierung müssen auch noch physikalische Parameter der Optik mit in die CTF-Generierung einfließen. Dieser Unterabschnitt wird sich lediglich auf die numerische Apertur beschränken, da die anderen Parameter in den folgenden Unterabschnitten herausgearbeitet werden. Neben der Sinusbedingung als Voraussetzung, die geometrisch als Parallelprojektion auf eine Kugelschale gesehen werden kann, ist es wichtig, die numerische Apertur eines Objektivs zu berücksichtigen. Die numerische Apertur $NA = n \sin(\alpha)$ beinhaltet den halben Öffnungswinkel $\alpha = \alpha_{max}$ des fokussierten Lichtkegels und den Brechungsindex n am Fokuspunkt. Während sich der Radius der Ewaldkugel über die Reskalierungsfaktoren der DFT ergibt, kann über den Brechungsindex und die numerische Apertur des Objektivs auf den Öffnungswinkel der ebenen Wellen am Objekt geschlossen werden.

$$\alpha_{max} = \arcsin\left(\frac{NA}{n}\right) \quad (3.17)$$

Alternativ kann auch der Radius $k'_{\text{Fokalebene}}$ der zu projizierenden hinteren Fokalebene im Fourierraum berechnet werden:

$$k'_{\text{Fokalebene}} = \frac{NA}{n} k_{\text{Ewald}} \quad (3.18)$$

So lässt sich für die Sinusbedingung $g(\theta) = \sin(\theta)$ (vgl. Abschnitt 2.3.2) die Position (x, y) in der hinteren Fokalebene über dessen Aperturradius r mit den Wellenvektoren \vec{k} der CTF verknüpfen:

$$\frac{x}{r} = \frac{\sin(\theta_x) f}{\sin(\alpha_{max}) f} = \frac{k_x / k_{\text{Ewald}}}{\frac{NA}{n}} = \frac{k_x}{k'_{\text{Fokalebene}}} = \hat{k}_x \quad (3.19)$$

$$\frac{y}{r} = \frac{\sin(\theta_y) f}{\sin(\alpha_{max}) f} = \frac{k_y / k_{\text{Ewald}}}{\frac{NA}{n}} = \frac{k_y}{k'_{\text{Fokalebene}}} = \hat{k}_y \quad (3.20)$$

über die Ausdrücke miteinander verknüpfen. Die CTF eines monochromatischen Systems ($\omega = \omega_0$) kann somit durch:

$$\text{CTF}_{3d}(\tilde{\mathbf{k}}) = \text{CTF}_{3d}(\vec{k}, \omega = \omega_0) = \delta(k_{\text{Ewald}} - |\vec{k}|) E_{\text{Fokalebene}}(r \hat{k}_x, r \hat{k}_y, \omega_0) \quad (3.21)$$

ausgedrückt werden. Hier wird auch deutlich, dass der Term $\delta(k_{\text{Ewald}} - |\vec{k}|)$ verhindert, dass alle aus der hinteren Fokalebene bekannten Werte auf ein kubisches

Raster abgebildet werden. Im Gegensatz zum analytischen Ansatz kann hier auf die Normierung mit $\frac{P(\theta)}{P(r(\theta))}$ verzichtet werden, da die Leistungsdichte bereits in der Anzahl der projizierten Punkte enthalten ist.

3.2.2. 4d-Fokus (Zeitliche Propagation)

Das zeitliche Verhalten des Lichtfeldes ist nur von Interesse, wenn mindestens zwei Frequenzen an der Fokusbildung beteiligt sind. Daher muss die CTF um eine Frequenzdimension erweitert werden.

$$\text{CTF}_{4d}(\vec{k}, \omega) = \delta(k_{\text{Ewald}}(\omega) - |\vec{k}|(\omega)) E_{\text{Fokalebene}}(r \hat{k}_x, r \hat{k}_y, \omega) \quad (3.22)$$

Nun gibt es zwei Möglichkeiten, diese CTF auszuwerten. Die Erste, vermeintlich leichtere, ist eine vierdimensionale FFT durchzuführen, die analog zu Abschnitt 3.2.1 die CTF diskretisiert. Im Normalfall ist $k_{\text{Ewald}}(\omega)$ streng monoton von $|k|$ abhängig. Somit würde jede einzelne Ewaldschale in einem eigenen Volumen gespeichert werden, was eine sehr schlechte Nutzung des Arbeitsspeichers darstellt, und auch aktuelle Computer (noch) an ihre Grenzen stoßen lässt. Außerdem kann es auch von Interesse sein, das Volumen möglichst groß zu wählen. Statt also eine vierdimensionale FFT durchzuführen, ist es in diesen Fällen auch möglich, die Zeitpropagation mit einer dreidimensionalen Phasenmaske auf die CTF anzuwenden. Eine Phasenmaske $\varphi_t(k)$ gilt hierbei für jeweils einen speziellen Zeitpunkt t . Die Phase folgt aus Gleichung (2.35):

$$\vec{E}(\vec{k}, t) = \int dk \vec{E}(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} - \frac{|\vec{k}|}{n(|\vec{k}|)} ct)} = \int dk \vec{E}(\vec{k}) e^{i(\vec{k}\vec{r} + \varphi_t(\vec{k}))} \quad (3.23)$$

$$\Rightarrow \varphi_t(\vec{k}) = -\frac{|\vec{k}|}{n(|\vec{k}|)} ct \quad (3.24)$$

In diesem Fall kann die CTF wieder auf drei Dimensionen reduziert werden:

$$\text{CTF}_{3d\omega}(\vec{k}) = \delta(k_{\text{Ewald}}(\omega(|\vec{k}|)) - |\vec{k}|) E_{\text{Fokalebene}}(r \hat{k}_x, r \hat{k}_y, \omega(|\vec{k}|), n(|\vec{k}|)) \quad (3.25)$$

3.2.3. (De-)Polarisation

Die bisher ermittelten CTF sind lediglich für kleine Öffnungswinkel gültig. Durch die Verkipfung einer zuvor x- oder y-polarisierten und in z-Richtung propagierenden Welle treten auch andere Polarisationskomponenten auf. Um die Anteile der jeweiligen Polarisationsrichtungen für jede individuelle ebene Welle zu bestimmen, kann die Vorstellung aus 2.1 genutzt werden, die CTF zunächst in Kugelkoordinaten darzustellen. Die ungebrochene Welle propagiere in positiver Richtung der z-Achse. Tritt keine sonstige Drehung der Polarisation auf, können die neuen elektrischen Amplituden durch die Rotation $R(\vec{e}_\varphi, \theta)$ der einfallenden Polarisierungen in x- und y-Richtung um \vec{e}_φ , welcher orthonormal auf dem Radialvektor der hinteren Fokusapertur steht, mit

dem Ablenkwinkel θ (vgl. Abbildung 2.2) bestimmt werden [Gu00, Mer01, Arn07]. So kann \vec{E} aus der hinteren Fokalebene in den rotierten E-Vektor \vec{E}_{neu} überführt werden:

$$\vec{E}_{neu} = R(\vec{e}_\varphi, \theta) \vec{E} = (1 - \cos \theta) \vec{e}_\varphi \vec{E} \vec{e}_\varphi + \vec{E} \cos \theta + (\vec{e}_\varphi \times \vec{E}) \sin \theta \quad (3.26)$$

$$= E_x \begin{pmatrix} \cos \theta - (\cos \theta - 1) \sin^2 \varphi \\ (\cos \theta - 1) \sin \varphi \cos \varphi \\ \cos \varphi \sin \theta \end{pmatrix} + E_y \begin{pmatrix} (\cos \theta - 1) \sin \varphi \cos \varphi \\ \cos \theta - (\cos \theta - 1) \cos^2 \varphi \\ \sin \varphi \sin \theta \end{pmatrix} \quad (3.27)$$

\vec{E}_{neu} ist in kartesischen Koordinaten dargestellt. Auf diese Weise sind die Amplituden in allen drei Polarisationsrichtungen bekannt. Nach der allgemeinen Lösung der Wellengleichung kann jede Polarisationsrichtung nun separat berechnet werden. Dies erlaubt es, die bereits ermittelten CTF durch Angabe der Polarisationsverhältnisse in jedem Punkt, oder einer einfachen linearen Polarisation in drei neue und unabhängige CTF zu zerlegen. Der allgemeine Fall lautet somit:

$$\overrightarrow{\text{CTF}}(k, \omega) = R(\vec{e}_\varphi(\vec{k}), \theta(\vec{k})) \frac{\vec{E}(\vec{k})}{|\vec{E}(\vec{k})|} \text{CTF}(\vec{k}, \omega) \quad (3.28)$$

3.3. Dimensionsreduktion

Wie im vorigen Abschnitt bereits erklärt wurde, stellt der Arbeitsspeicher des Computers ein beschränkendes Element für die Berechnungen dar. Im Folgenden werden zwei Spezialfälle gezeigt, in denen die Dimension der CTF weiter reduziert werden kann, ohne einen Informationsverlust hinzunehmen.

3.3.1. 2d-Raum

Wird der Fokus eines gänzlich rotationssymmetrischen Systems betrachtet, dessen CTF lediglich eindimensionale Modulationen erfährt, sind alle relevanten Informationen über den Fokus in einer ausgezeichneten Ebene aus Modulationsrichtung und Propagationsrichtung enthalten. Fällt die Modulationsrichtung auf die x-Achse, erlaubt dies die Fouriertransformation an der Stelle $x = 0$ auszuwerten.

$$\text{CTF}_{2d}(k_x, k_y) = \int dk_x \text{CTF}_{3d}(\vec{k}) \underbrace{e^{i(k_x x)}}_{=1} = \int dk_x \text{CTF}_{3d}(\vec{k}) \quad (3.29)$$

Die zweidimensionale CTF ist somit lediglich eine entlang der kollabierten Achse integrierte dreidimensionale CTF. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Dimensionsreduktion auf eine Ebene für alle anderen Schnittebenen ebenso möglich ist. Wird diese z.B. auf die CTF der xy-Ebene reduziert, erhält man eine äquivalente Formulierung zu der Formel (2.18) aus der Fourieroptik.

3.3.2. 2d-Raum zuzüglich zeitlicher Propagation

Auch die vierdimensionale CTF kann in einer Raumdimension reduziert werden. Analog zum Vorgehen aus 3.3.1 gilt:

$$\text{CTF}_{2d+t}(k_x, k_y, t) = \int dk_x \text{CTF}_{4d}(\vec{k}, \omega) \underbrace{e^{i(k_x x)}}_{=1} = \int dk_x \text{CTF}_{4d}(\vec{k}, \omega) \quad (3.30)$$

Es muss lediglich eine Integration entlang der k_x -Achse durchgeführt werden. Dies ist zwar nicht verwunderlich, allerdings stellt es eine Einschränkung der Reduzierung der CTF in der zeitlichen Dimension dar (vgl. Gleichung (3.23)). Im dreidimensionalen Fall ist es normalerweise lediglich nötig, die Phase $\varphi_t(\vec{k}) = -\frac{|\vec{k}|}{n(|\vec{k}|)}ct$ auf die CTF zu addieren, um die Zeitverschiebung t hervorzurufen. Dies müsste in diesem Fall allerdings vor dem Mitteln über die k_x -Achse durchgeführt werden. Da die Reduktion der Dimension mit dem Hintergedanken, den Arbeitsspeicher maximal auszulasten durchgeführt wird, erfordert dies für jeden Zeitpunkt eine komplette Neuberechnung von $\text{CTF}_{2d+t}(k_x, k_y, t)$. Die Neuberechnung dauert auf Grund der Interpolation der Werte allerdings so lange, dass mit größeren zeitlichen Einbußen gerechnet werden muss. So ist unter Umständen eine sinnvolle Umsetzung der zeitlichen Propagation mit einer Phasenmaske (vgl. Abschnitt 3.2.2) ausgeschlossen.

3.4. Interpolation

Bisher wurde immer eine hinreichend gute Interpolationsmethode vorausgesetzt. Da die Art der Interpolation entscheidenden Einfluss auf die Genauigkeit und die Berechnungsdauer besitzt, werden hier einige übliche Verfahren aufgezeigt und untereinander verglichen. Zudem werden einige Optimierungen der üblichen sinc-Kernel-Interpolation aufgezeigt.

Um die Interpolationsmethoden und die Begründungen für deren Qualität einheitlich darstellen zu können, wird ohne Beschränkung der Allgemeinheit der Beitrag eines willkürlichen Punktes zu einer ihn umgebenden Gitterposition erläutert. Hierfür muss lediglich die lineare Superposition der Interpolationsmethode gefordert werden dürfen.

3.4.1. Raster und Fehler

Alle Interpolationsmethoden, die in den folgenden Unterabschnitten vorgestellt werden, sind für jede Raum- bzw. Zeit-Dimension unabhängig ausführbar. Sie stellen Gewichtungsfunktionen dar, die zum einen durch Multiplikation für jede Dimension untereinander kombinierbar und zum anderen durch eine eindimensionale Repräsentation voll beschreibbar sind. Dabei wird wegen der FFT von einer äquidistanten Rasterung ausgegangen. Die Interpolation wird hier vor der Fouriertransformation benötigt, um eine CTF korrekt zu repräsentieren. Daher ist es von entscheidendem Interesse, wie groß die Fehler nach der FFT sind. Zunächst muss klar sein, wo

interpoliert werden muss. Nun existiert bereits eine in ihrer Anzahl und Amplitude normierte Schar an Stützstellen, die z.B. aus der hinteren Aperturebene des Objektivs bekannt sind und äquidistant gerastert dargestellt werden. Aus Abschnitt 3.2.1 ist bereits bekannt, dass es sich im idealisierten Fall um Deltafunktionen handelt, was es erlauben würde, diese Funktionen in die analytische Lösung der CTF einzusetzen. Anschaulich ergäbe dies eine drei- bzw. vierdimensionale Punktwolke, die alle Anfangsinformationen der Simulation enthält. Diese Punkte fallen praktisch nie auf einen der Gitterpunkte der DFT, was verhindert diese Werte mit der DFT zu verarbeiten. Daher müssen die Punkte eine endliche Ausdehnung erhalten, um noch auf die Gitterpunkte Einfluss auszuüben. Diese Ausdehnung kann als Faltung mit einem sogenannten Kernel verstanden werden. Das idealisierte Ziel ist es, einen Kernel zu finden, der nach der DFT ein Ergebnis liefert, dass mit dem der analytischen Werten an den Stützstellen übereinstimmt.

Um dies kategorisieren zu können, wurden sowohl Amplitude als auch Phase einer Impulsantwort auf genau einen interpolierten und gesetzten Wert analysiert. Hierbei werden alle Positionen zwischen -0.5 und $+0.5$ Pixel relativ zu dem zentralen Stützpunkt in 500 äquidistanten Schritten untersucht. Durch die Linearität der FFT gilt das Superpositionsprinzip. Daher kann das Ergebnis nachher auf jede CTF verallgemeinert werden.

Der Idealfall von Amplitude und Phase ist analytisch gegeben durch:

$$E(k, x) = \int_{-\infty}^{\infty} dk_x \delta(k_x - k) e^{i(k_x x)} = e^{i(kx)} \quad (3.31)$$

Die Amplitude ist somit konstant und die Phase linear in x skaliert mit dem Vorfaktor k . k liegt für die Analyse zwischen $0,5$ px und $0,5$ px. Durch die Skalierungsverhältnisse aus Abschnitt 3.1.2 gilt $1\text{px} = 2\pi$ und damit auch $-\pi < k < \pi$. Zwar existieren zu den folgenden Interpolationen bereits Veröffentlichungen, die deren Interpolationsqualität und Spektrum untersuchen, jedoch war hierbei die Phase von geringerem Interesse und es wurde hauptsächlich auf die Amplituden der Spektren eingegangen [Mei99, Leh99, Leh01].

Abbildung 3.2 stellt sowohl die Abweichung von der idealen Amplitude als auch die Abweichung von der idealen Phase dar. Die Messungen wurden beispielhaft für eine Kantenlänge des Zielvolumens von 256 Pixeln durchgeführt, wobei Pixel 128 die Nullfrequenz und damit auch die Mitte des simulierten Abschnittes darstellt. Bei den Darstellungen handelt es sich um den maximalen Fehler pro Position bzw. Pixel, der bei den 500 äquidistanten Interpositionspositionen, bei Abständen zwischen $-0,5$ Pixeln und $+0,5$ Pixeln zur nächsten Stützstelle, auftrat. Weiterhin wird noch zwischen normierten und unnormierten Werten unterschieden. In diesem Zusammenhang bedeutet dies, dass auf den Mittelwert über die verschiedenen Interpositionspositionen eines jeden Pixels normiert wird. Bei einer Amplitude wird hierfür durch den Mittelwert dividiert, bei einer Phase wird der Mittelwert subtrahiert (vgl. Abschnitt 3.4.7).

Auf die einzelnen Interpositionsarten wird im Detail in den folgenden Abschnitten eingegangen. Um zusätzlich einen praxisnahen Vergleich zu ermöglichen, wurde ein

Femtosekundenfokus zum Zeitpunkt der höchsten Intensität mit jeder Interpolationsmethode einmal simuliert. Hierfür wurde die CTF mit Gleichung (3.25) berechnet und durch insgesamt 14980 Werte repräsentiert. Durch die Mittelung aller durch das Abbilden der Ewaldkugel auf das Raster entstehenden Fehler führt dies zu genaueren Ergebnissen, als es durch die Impulsantwort eines einzelnen Wertes zu erwarten wäre. Zusätzlich wurde bei allen Methoden eine nachträgliche positionsabhängige Intensitätsanpassung durchgeführt (vgl. 3.4.7). Bei den sinc-Interpolationen wurde die Kernelbreite auf 11 Stützstellen beschränkt. Das simulierte System besteht aus einem fs-Laser, der durch ein homogen ausgeleuchtetes Mikroskopobjektiv mit einer NA von 0,2 und einer spektralen Verteilung eines Hanning-Fensters (im Frequenzraum, vgl. Abbildung 3.5) gewählt.

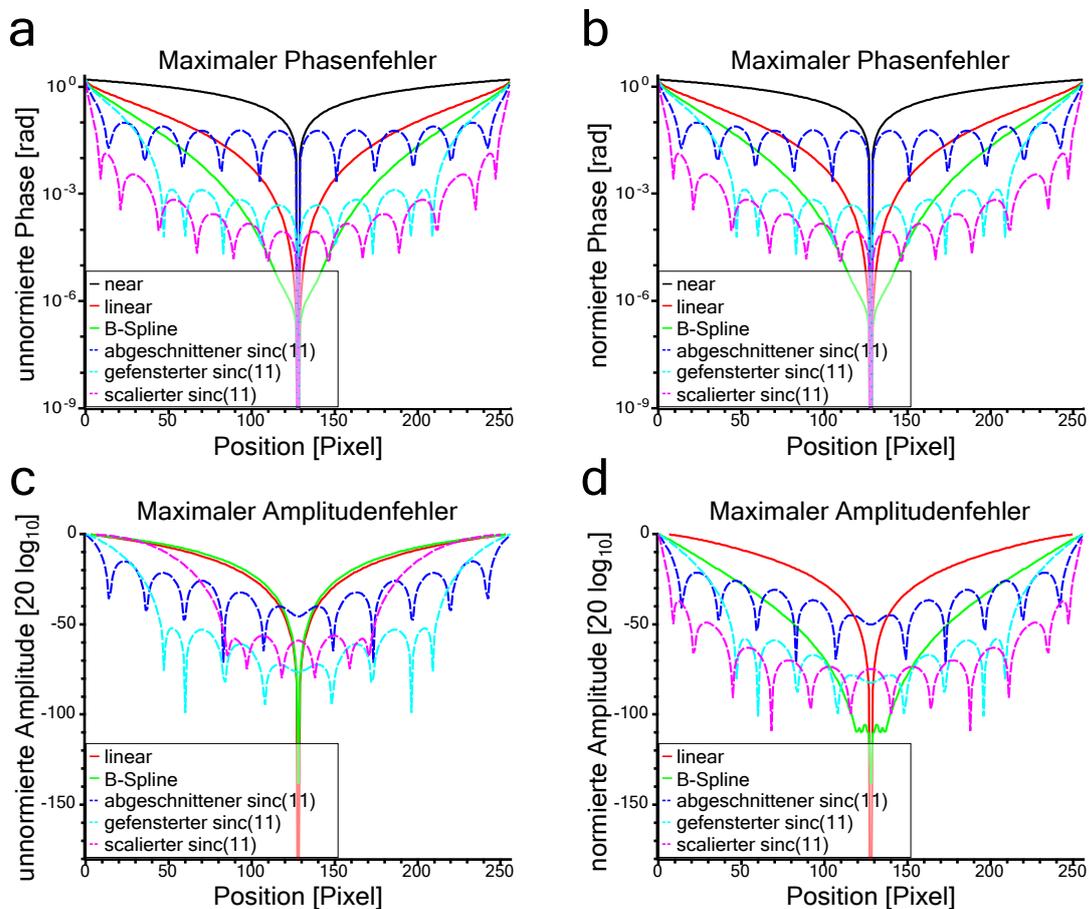


Abbildung 3.2.: Darstellung der maximalen Amplituden und Phasenfehler an einer Position im transformierten Raum durch eine von 500 Punktinterpolationen zwischen $-0,5$ und $0,5$ Pixelabstand zum Raster. Die in Klammern angegebenen Werte (11) geben die Kernelbreite B wieder (Abschnitt 3.4.5) (a) Maximaler Phasenfehler ohne weitere Normierung. (b) Maximaler Phasenfehler mit Normierung nach Abschnitt 3.4.7. (c) Maximaler Amplitudenfehler ohne weitere Normierung. (d) Maximaler Amplitudenfehler mit Normierung nach Abschnitt 3.4.7.

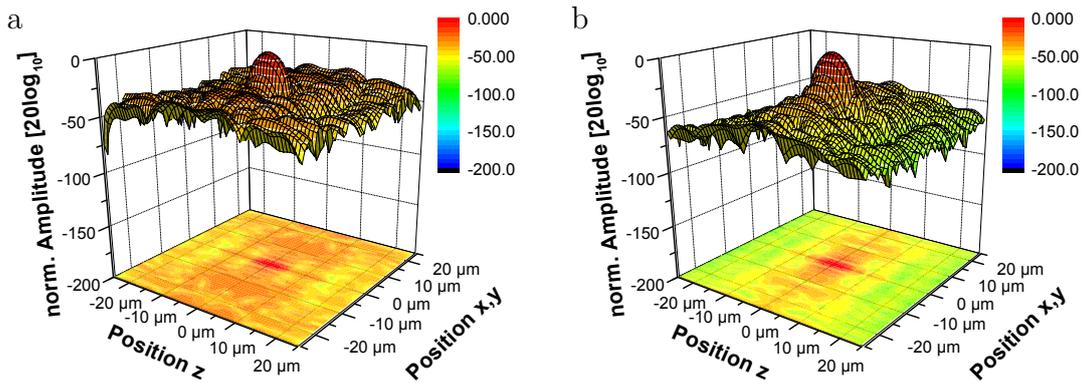


Abbildung 3.3.: Simulation eines fs-Fokus ($NA = 0,2$, $\lambda_{\min}=700$ nm, $\lambda_{\max}=900$ nm)
 (a) Simulation mit der Nächsten-Nachbar-Methode. (b) Simulation mit der linearen Interpolationsmethode.

Das Spektrum beginnt bei 700 nm und endet bei 900 nm Wellenlänge. Diese Art von Fokus fällt mit zunehmendem Abstand vom Ursprung verhältnismäßig schnell in seiner Intensität ab. Daher sind Aliasingeffekte², die sich durch Reflexionen am Rand äußern, vernachlässigbar. Aliasingeffekte sind nicht als statistischer Fehler anzusehen und lassen sich über das Dämpfungsverhalten der Interpolationsmethode außerhalb des simulierten Volumens beschreiben. Da im letzten Entwicklungsschritt eine gefensterte Interpolation angestrebt wird, lässt sich die Charakteristik des Aliasings über die Wahl der Fensterung einstellen.

3.4.2. Nächster-Nachbar-Interpolation

Unter der Nächsten-Nachbar-Interpolation, oder auch “nearest neighbor interpolation” aus dem Englischen, versteht man ein Verfahren bei dem eine Position zu der nächstgelegenen Gitterstelle gerundet wird. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für einfache Lichtfeldberechnungen eingesetzt [Why05]. Der Wert wird für die Verschiebung nicht angepasst, was offensichtlich bereits einen kleinen Fehler birgt, da dies nur auf einen Datensatz zutreffen kann, der überall konstant ist. Durch die Abbildung der hinteren Fokalebene mit Gleichung (3.22) auf die CTF fallen die Zielpunkte nicht auf die Stützpunkte der äquidistanten Matrix. Hierdurch ist nicht gewährleistet, dass zu viele oder zu wenige Werte einem bestimmten Punkt zugeordnet werden. Die Addition der einzelnen Werte zu den Stützpunkten der Zielmatrix führt so zu ungewollten Schwankungen in der Homogenität. Das hierdurch erzeugte Abtastverhalten ist mit dem aus der Signalverarbeitung bekannten Jitter, also der Ungenauigkeit des Stützgitters, vergleichbar.

Die Untersuchung der Phasen und Amplitudenfehler zeigt, dass zwar eine konstante Intensität gewahrt wird, weshalb auf die Darstellung in Abbildung 3.2d verzichtet wurde, jedoch schwankt die Phase (Abbildung 3.2b) gegenüber dem gewünschten

²Aliasing wird durch die Faltung mit dem periodischen sinc-Kamm aus Abschnitt 3.1.2 hervorgerufen. Im Frequenzraum entstehen so Reflexionen und Verschiebungen des eigentlich außerhalb liegenden Spektrums. Im Ortsraum äußert sich dies durch einen „Treppeneffekt“.

Verhalten um $-\frac{\pi}{2} \dots \frac{\pi}{2}$. Dies äußert sich bei der Beispielsimulation (Abbildung 3.3a) durch einen Rauschteppich, der um -40 dB schwankt.

$$W_{\text{near}}(x_{\text{Gitter}}) = W(x) \Pi(s) = W(x) \Pi\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \quad (3.32)$$

s ist hierbei der Abstand von der Stützstelle $x - x_{\text{Gitter}}$ normiert auf den Abstand der Stützstellen Δx_{Gitter} . Um damit die Interpolation durchzuführen, ist es notwendig, den tatsächliche Wert W an der Position x mit der Interpolationsfunktion an jedem Gitterpunkt x_{Gitter} auszuwerten und den so erhaltenen Wert W_{near} zuzuweisen. Für die Implementierung kann genutzt werden, dass $\text{near}(s)$ fast immer Null entspricht, was es unnötig macht, die Funktionen an diesen Punkten auszuwerten.

3.4.3. Lineare-Interpolation

Die Lineare-Interpolation ist der nächstkomplexere Ansatz und wird in vielen Bereichen der Computerberechnungen erfolgreich eingesetzt [Leh99, Ke95]. Der Beitrag zu den benachbarten Werten $W_{\text{lin}}(x_{\text{Gitter}}, x)$ errechnet sich hierbei durch eine mit dem Abstand linear abnehmende Funktion $\text{lin}(s)$. Obwohl nun sowohl Schwerpunkt der Intensität als auch die Gesamtintensität korrekt sind, zeigt die Analyse nach der Fouriertransformation zwar eine deutliche Verbesserung des Phasenverhaltens (Abbildung 3.2b), jedoch fällt die Intensität nun zu hohen Frequenzen hin ab (Abbildung 3.2d). Dies bedeutet, dass die Methode stets zum Auflösungsverlust bei der CTF Darstellung führt. Dennoch liegt der Hintergrund in der Beispielsimulation um knapp 20dB tiefer als bei der Nächsten-Nachbar-Methode.

$$\text{lin}(s) = \begin{cases} 1 - |s| & |s| < 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.33)$$

$$W_{\text{lin}}(x_{\text{Gitter}}) = W(x) \text{lin}\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \quad (3.34)$$

$\text{lin}(s)$ stellt hierbei die lineare Interpolation dar.

3.4.4. B-Spline-Interpolation

Um auch Interpolationsmethoden höherer Ordnungen zu untersuchen, wurde eine B-Spline-Interpolation mit Koeffizienten gewählt, die bereits effizient auf Grafikkarten („Graphics Processing Unit“ bzw. GPU)-Hardware umgesetzt wurde [Rui08]. Die B-Spline-Interpolation stellt in dieser Auswahl - neben der späteren Anpassung der sinc-Interpolation (siehe Abschnitt 3.4.7) - die einzige Methode dar, die, wenn sie genau auf einen Gitterpunkt fällt, nicht nur diesem einen Wert zuweist. Vor allem in der normierten Version werden verhältnismäßig gute Werte von unter -100 dB in der Nähe des Simulationszentrums erzielt. Für höhere Frequenzen ist allerdings immer noch eine starke Fehlerzunahme zu beobachten (Abbildungen 3.2b und 3.2d). Der Vergleich der Testsimulationen (Abbildung 3.3 mit Abbildung 3.4a) zeigt jedoch,

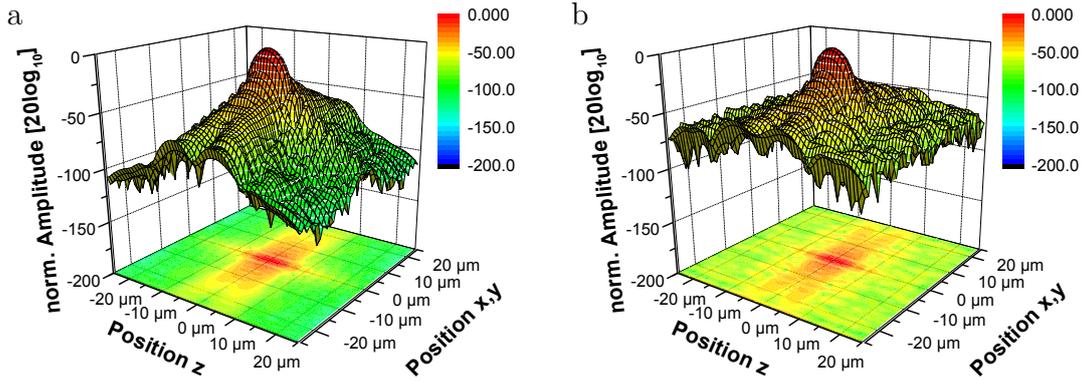


Abbildung 3.4.: Simulation eines fs-Fokus ($NA = 0,2$, $\lambda_{\min}=700$ nm, $\lambda_{\max}=900$ nm)
 (a) Simulation mit der B-Spline-Methode. (b) Simulation mit der sinc-Interpolationsmethode.

dass die Randbereiche unter -100 dB fallen und somit die bisher höchste Qualität erzielt wird.

$$\text{bspline}(s) = \begin{cases} 0 & |s| \geq 2 \\ \frac{1}{6} \cdot (2 - |s|)^3 & 1 \leq |s| < 2 \\ \frac{2}{3} - \frac{1}{2}|s|^2 \cdot (2 - |s|) & |s| < 1 \end{cases} \quad (3.35)$$

$$W_{\text{lin}}(x_{\text{Gitter}}) = W(x) \text{bspline}\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \quad (3.36)$$

Die Darstellung der Werte ist analog zu Formel (3.32). $\text{bspline}(s)$ stellt hierbei die kubische B-Spline-Interpolation dar. Hierbei müssen nun jeweils vier Stützstellen berechnet werden statt zwei wie zuvor.

3.4.5. Sinc-Interpolation

In Abschnitt 3.1.2 wurde deutlich, dass eine FFT die analytische Information mit einem Kamm aus sinc-Funktionen faltet. Daher sollte ein Kernel, der aus dem entsprechenden periodischen Ausschnitt dieses Kammes besteht, eine exakte Lösung liefern. Um Rechenzeit zu sparen, wird hier allerdings sowohl auf den Einfluss der Wiederholung des sinc, als auch auf dessen volle Ausdehnung verzichtet und lediglich auf eine festgelegte Kernbreite B angewandt. Es handelt sich damit um eine Abwandlung der idealen Interpolation zu Gunsten der Rechenzeit. In diesem und den beiden folgenden Beispielen wird eine Breite von 11 Stützpunkten gewählt. Je mehr Stützpunkte hinzukommen, desto besser werden die Interpolationseigenschaften des Kernels. Die Impulsantwort zeigt eine nahezu rechteckige Intensitätsverteilung und ein homogenes Phasenverhalten. Bei einer logarithmischen Darstellung (Abbildungen 3.2b und 3.2d) wird allerdings deutlich, dass sowohl die Amplitude als auch die Phase ortsabhängig schwanken. Trotz des höheren Rechenaufwandes ist die Qualität der Beispielsimulation durch die Beschränkung der sinc-Funktion auf eine Kernbreite

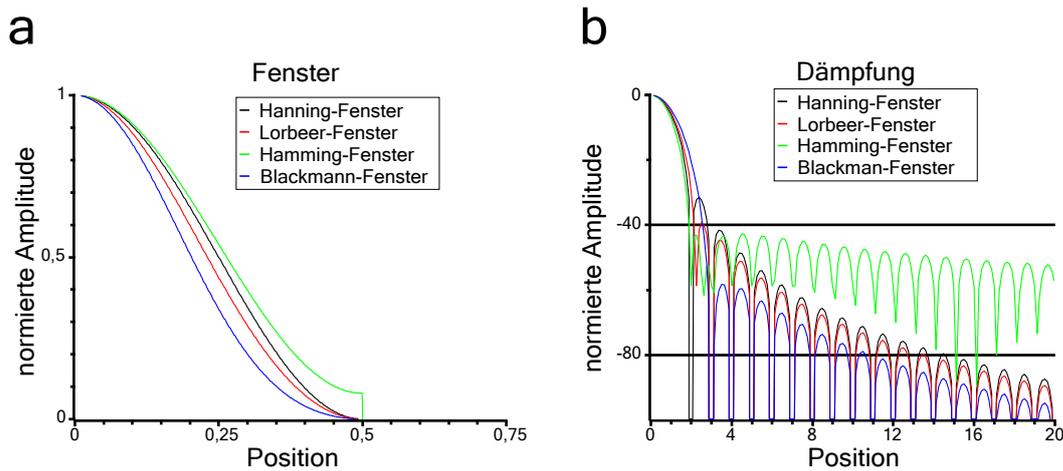


Abbildung 3.5.: Einige Fenster für die Fouriertransformation: Hanning-, Hamming-, Lorbeer- und Blackman-Fenster. (a) Halbseitige Darstellung der in Amplitude und Breite normierten Fenster. (b) Fouriertransformierte Darstellung der in (a) dargestellten Fenster.

von $H = 11$ Stützstellen wieder geringer als bei der B-Spline-Interpolation (Abbildung 3.4).

$$\text{sinc}_{\text{Kernel}}(s) = \begin{cases} \frac{\sin(\pi s)}{\pi s} & |s| < \frac{H}{2} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.37)$$

$$W_{\text{sinc}}(x_{\text{Gitter}}) = W(x) \text{sinc}_{\text{Kernel}}\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \quad (3.38)$$

Die Darstellung der Werte ist analog zu Formel (3.32). $\text{sinc}_{\text{Kernel}}(s)$ stellt hierbei die sinc-Interpolation dar.

3.4.6. Gefensterter sinc-Interpolation

Alle bisherigen Interpolationsmethoden neben der B-Spline Methode sind an deren Kernelenden nicht stetig oder stetig differenzierbar. Hierfür wird bei sinc-Kernen üblicherweise eine Fensterung durchgeführt [Mal93]. Auf Grund der Vielzahl an Fenstern und deren Eigenschaften überschreitet die Anzahl der Möglichkeiten die hier untersuchten Varianten.

Die üblichen Fenster können als Kosinusreihe dargestellt [Nut81] und dann mit einem sinc-Kernel kombiniert werden.

$$\text{fenster}(s) = \begin{cases} \sum_{i=0}^n a_i \cos(2\pi \frac{s}{H}) & |s| < \frac{H}{2} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.39)$$

$$W_{\text{sinc}}(x_{\text{Gitter}}) = W(x) \text{fenster}\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \text{sinc}_{\text{Kernel}}\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \quad (3.40)$$

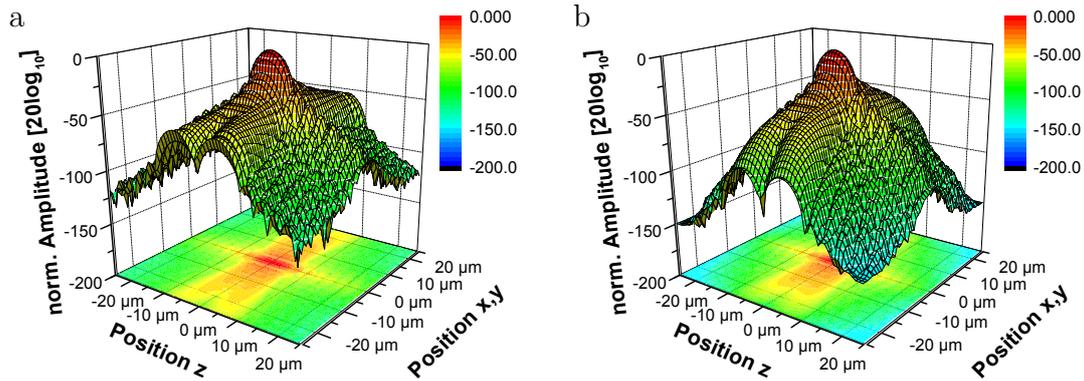


Abbildung 3.6.: Simulation eines fs-Fokus ($NA = 0,2$, $\lambda_{\min}=700$ nm, $\lambda_{\max}=900$ nm)
 (a) Simulation mit der gefensterten sinc-Interpolationsmethode.
 (b) Simulation mit der skalierten und gefensterten sinc-Interpolationsmethode.

Die Darstellung der Werte ist analog zu Formel (3.38). $\text{fenster}(s)$ stellt hierbei das Fenster mit der Breite H für die Interpolation dar. In Abbildung 3.5a sind einige Fenster dargestellt, die eingesetzt werden können. Da bei einer Fensterung wieder eine Multiplikation im Fourierraum stattfindet, kann die Güte der Fenster über ihre Fouriertransformierten beurteilt werden. Das Ziel ist ein möglichst schneller Abfall des Signals zur Vermeidung von Aliasing oder anderen unerwünschten Effekten. Abbildung 3.5b zeigt das Abklingverhalten der Beispielfenster. Ein Fenster mit zu vielen Koeffizienten a_i erzeugt eine breitere nullte Ordnung, fällt dafür allerdings steiler ab [Nut81]. Daher ist die erste Nullstelle des Blackman-Fensters³ am weitesten vom Ursprung entfernt. Das Hamming-Fenster⁴ erzeugt zwar die schmalste erste Ordnung, fällt dafür allerdings nur sehr langsam ab. Sowohl das Lorbeer-⁵ als auch das Hanning-Fenster⁶ sind stetig und besitzen eine relativ schmale erste Ordnung. Beim Lorbeer-Fenster wird mit einer leichten Verbreiterung eine zusätzliche Dämpfung von 3dB⁷ erzielt. Daher wurde dieses Fenster für die endgültige Simulation ausgewählt.

Die Verbesserung gegenüber dem ungensterten sinc-Kernel ist signifikant. Sowohl Amplitude als auch Phase verbessern sich in der inneren Hälfte um mehr als 15dB (Abbildungen 3.2b und 3.2d). Dies wird auch durch die Vergleichssimulation (Abbildung 3.6a), die die bisher stärkste Dämpfung im Randbereich erreicht, bestätigt.

³Als Koeffizienten für das Fenster wurden die Werte: $a_0 = 0,42$; $a_1 = 0,5$; $a_2 = 0,08$ aus [Nut81] verwendet.

⁴ $a_0 = 0,54$; $a_1 = 0,46$

⁵Das Lorbeer-Fenster wurde durch die in [Nut81] dargestellte Methodik entwickelt. Die Koeffizienten lauten: $a_0 = \frac{15}{32}$; $a_1 = \frac{1}{2}$; $a_2 = \frac{1}{32}$. Diese Koeffizienten bewirken, dass die Fensterfunktion sowie deren vierte und alle ungeraden Ableitungen stetig in die Nullfunktion übergehen.

⁶ $a_0 = 0,5$; $a_1 = 0,5$

⁷als Basis zur Berechnung dient hier $20 \log_{10}$

3.4.7. Skalierte sinc-Interpolation

Alle bisherigen Methoden außer der B-Spline-Interpolation erfüllen die Bedingung, dass bei der Interpolation auf den Stützstellen die gesamte Intensität auf die jeweilige Stelle fällt. Der Nachteil an dieser Eigenschaft besteht darin, dass hierdurch der Fehler, den die Interpolation gegenüber der normalen Repräsentation besitzt, verschwindet. Würde der Fehler konstant bleiben bzw. systematisch werden, kann durch eine nachträgliche Normierung, wie sie bereits in Abbildung 3.2 dargestellt wird, jegliche Schwankung, die nicht von den Unterschieden zwischen den einzelnen Interpolationspunkten herrühren, ausgeglichen werden. Wird daher die sinc-Funktion zusätzlich um den hier beispielhaft gewählten Faktor $\xi = \frac{1}{0,7}$ gestreckt und mit $\frac{1}{\xi}$ normiert, kann mit einer nachträglichen ortsabhängigen Normierung von Phase und Amplitude eine weitere Verbesserung erzielt werden (Abbildungen 3.2b und 3.2d). Die Femtosekundenfokussimulation (Abbildung 3.6b) zeigt den bisher stärksten Abfall mit rund -150 dB. Weiterhin zeichnet sich ein deutlicher Unterschied gegenüber allen bisherigen Simulationen im Bereich des Randes für z-Positionen zwischen -10 μm und +10 μm ab.

$$W_{\text{sinc}}(x_{\text{Gitter}}) = W(x) \text{fenster}\left(\frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \frac{1}{\xi} \text{sinc}_{\text{Kernel}}\left(\xi \frac{x - x_{\text{Gitter}}}{\Delta x_{\text{Gitter}}}\right) \quad (3.41)$$

Die Darstellung der Werte ist hier wieder analog zu Formel (3.38).

3.5. Simulationen und erhöhte Tiefenschärfe

Mit dem Wissen aus den vorigen Abschnitten können nun beliebige Fokusfelder simuliert werden. Hier werden einige Beispiele dargestellt, die sowohl für die späteren Kapitel von Interesse sind, als auch die Möglichkeiten der Simulation demonstrieren sollen. Einige der Möglichkeiten wurden bereits in einer vorherigen Veröffentlichung [Lor09b] aufgezeigt.

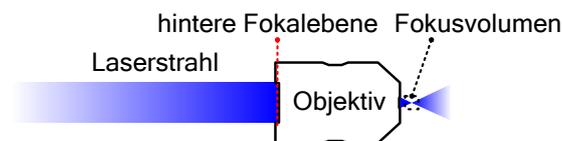


Abbildung 3.7.: Schema des simulierten Aufbaus. Ein Laserstrahl, dessen örtliche Phasen-, Intensitäts- und Spektralverteilung, sowie dessen zeitlicher Verlauf, in der hinteren Fokalebene bekannt sind wird mit einem Mikroskopobjektiv fokussiert.

Die folgenden Simulationen sind alle für die Propagation im Vakuum bzw. in Luft durchgeführt worden. Sofern nicht anders angegeben wird das Lichtfeld auf der optischen (z)-Achse von links in die Darstellungen eingestrahlt. Abbildung 3.7 stellt den simulierten Aufbau schematisch dar. Die Phase, Intensität und das Spektrum

sind in jedem Punkt der hinteren Fokalebene bekannt. Die Hinter Fokalebene kann in den Polarkoordinaten \hat{r} und φ ausgedrückt werden, wobei \hat{r} auf den Öffnungsradius der hinteren Apertur normiert ist. Die über diese Parameter definierte Feldverteilung wird von einem Mikroskopobjektiv fokussiert.

3.5.1. Aberrationen

Aberrationen sind Verzerrungen in der Phase der Lichtwellen, die die korrekte Interferenz am Fokus verhindern und so zum einen die Auflösung und zum anderen den Kontrast reduzieren.

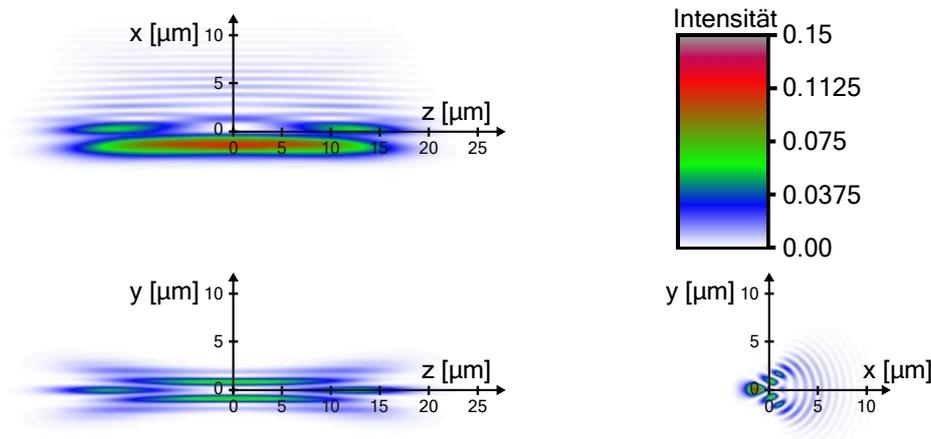


Abbildung 3.8.: Simulation des Koma-Linsenfehlers. Als Fehleramplitude wurden 4π rad gewählt. Die NA beträgt 0,2 und die Wellenlänge 532 nm. Die dargestellte Intensitätsskala wurde auf 15 % beschränkt.

Die Phasenfehler werden üblicherweise durch zweidimensionale Polynome, die die Phase in der hinteren Fokusapertur darstellen beschrieben. Hierzu zählen die orthonormalen Zernike-Polynome [Fer06b, Lia94, Mah82, Sch02, Sch04] die durch die Summe der Zernike-Summanden dargestellt werden:

$$Z = \sum_{i=-m}^m \sum_{j=0}^n a_{ij} Z_j^i \quad (3.42)$$

Die Summanden Z_j^i sind nur für $|i| \leq j$ von null verschieden. a_{ij} stellt hierbei die jeweilige Phasenamplitude dar. Abbildung 3.8 zeigt die Intensitätsverteilung in der Fokusebene für 4π rad Phasenamplitude der Koma-Verzerrung (Zernike-Summand $Z_3^1 = (3\hat{r}^3 - 2\hat{r}) \sin(\varphi)$). Der Laserstrahl hat eine Wellenlänge von 532 nm und das Mikroskopobjektiv besitzt eine NA von 0,2 (vgl. Abbildung 3.7). Der Darstellungsbereich in Abbildung 3.8 wurde auf 15 % der Intensität beschränkt, um das gesunkene Strehlverhältnis (vgl. Unterabschnitt 3.5.1) zu berücksichtigen.

3.5.2. Besselstrahl & fs-Besselstrahl

Ein Besselstrahl ist der übliche Ansatz zur Erhöhung der Tiefenschärfe bei gleichbleibender Auflösung. Da dieser Ansatz auch in den folgenden Kapiteln verfolgt wird, ist es naheliegend, dessen Eigenschaften mit der bestehenden Simulationssoftware zu untersuchen. Abbildung 3.9 zeigt eine Auswahl der hierdurch gewonnenen Daten. Der Vergleich der PSF (Abbildung 3.9c) zeigt, dass der mit einem fs-Laser erzeugte

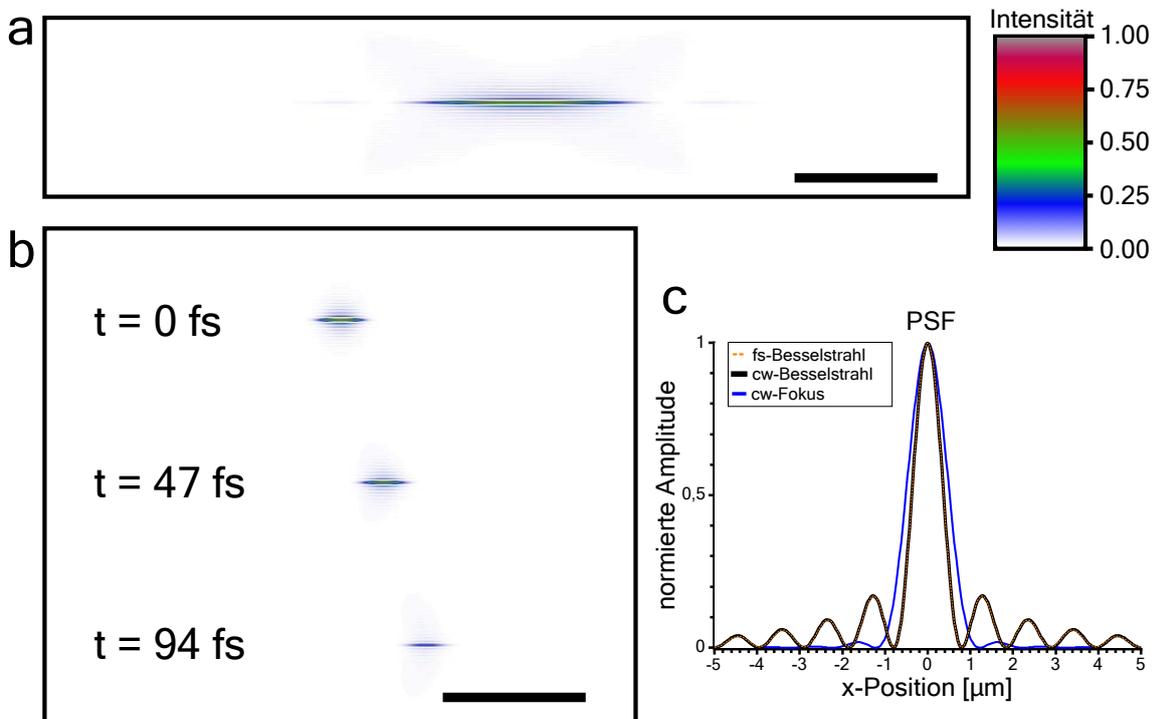


Abbildung 3.9.: Besselfokusse bei einer fokussierenden NA von 0,4. Die ausgeblendete NA beträgt 0,36. Die Skalierungsbalken stellen $50 \mu\text{m}$ dar. (a) cw-Strahlquelle mit einer Wellenlänge von 800 nm (b) fs-Strahlquelle mit einem Wellenlängenbereich von 750 nm bis 850 nm (c) Vergleich der normierten PSFs des zeitlich gemittelten fs-Besselfokusses mit dem cw-Besselfokus und einem mit voller Apertur ($NA = 0,4$, $\lambda = 800 \text{ nm}$) fokussierten Laserstrahls in der Fokusebene.

Besselstrahl im zeitlichen Mittel eine praktisch identische Intensitätsverteilung zu dem cw-Besselstrahl aufweist. Der fs-Laserpuls kann den Besselstrahl allerdings nur sukzessiv ausleuchten (Abbildung 3.9b). Um einen Besselstrahl zu erzeugen wird die hintere Fokusebene mit einem schmalen Ring ausgeleuchtet (vgl. Abschnitt 4.3.1). Für diese Simulationen wurde eine Objektiv NA von 0,4 gewählt. Die ausgeblendete NA beträgt 0,36. Der fs-Laser emittiert von 750 nm bis zu 850 nm mit der Intensitätsverteilung eines Hanning-Fensters. Als Vergleich hierzu wurde mit der selben NA eine cw-Laserstrahlquelle, die bei 800 nm emittiert, simuliert. Anhand der PSF (Abbildung 3.9c) wird deutlich, dass die radialen Überschwinger deutlich höher ausfallen, als bei einem normalen Fokus mit einer NA von 0,4. Dies hat bei Bildaufnahmen mit einem Besselstrahl einen Kontrastverlust zur Folge (vgl. Abschnitt 4.3.3).

3.5.3. Stufenlinse

Ein einzelner Besselstrahl wird in der hintere Apertur als Ring dargestellt. Dieser füllt diese hintere Apertur bei weitem nicht aus. Daher kann es interessant sein, mehrere Besselstrahlen miteinander zu kombinieren.

Um die einzelnen Strahlen daran zu hindern, miteinander zu interferieren, kann bei einer spektral breiten Lichtquelle der Lichtweg für jeden einzelnen Ring in der hinteren Fokalebene um mehr als eine Kohärenzlänge erhöht werden. Die Kohärenzlänge entspricht der mit der Lichtgeschwindigkeit multiplizierten Kohärenzzeit (vgl. Abschnitt 2.5.2). Um diese Bedingung zu schaffen, kann ein stufenförmiger Spiegel oder eine stufenförmige Transmissionsoptik genutzt werden. Eine Transmissionsoptik wird auf Grund ihres Aussehens hier als Stufenlinse bezeichnet.

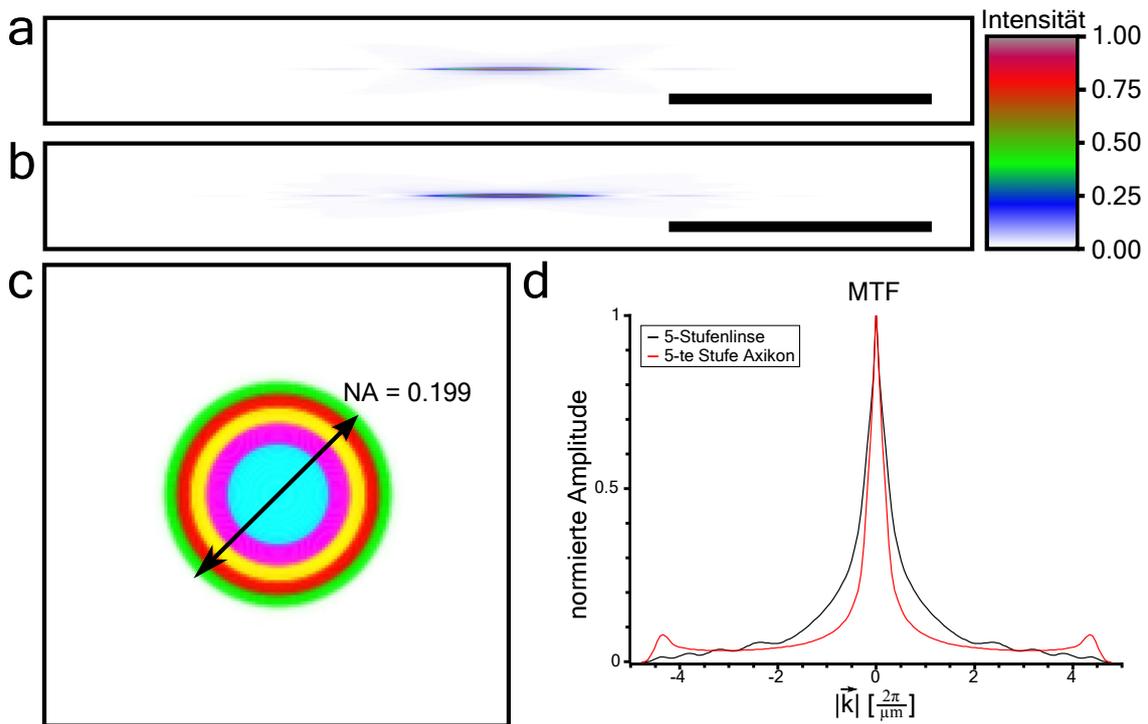


Abbildung 3.10.: Stufenlinsenfokus mit einer NA von 0,2. Die Aperturen der einzelnen Stufen können Tabelle 3.1 entnommen werden. Die Ausleuchtungswellenlänge beträgt 532 nm. Die Skalierungsbalken stellen 300 μm dar. (a) Querschnitt durch die zy-Ebene des Besselfokus der letzten Stufe. (b) Querschnitt durch die zy-Ebene des Stufenlinsenfokus. (c) Darstellung der Aperturen der einzelnen Stufen. (d) Normierte MTFs der Fokusse aus (a) und (b) in der Fokusebene.

Für die Simulation wurde eine Zentralwellenlänge des Lasers von 532 nm gewählt und eine 5-stufige Optik mit einer maximalen NA von 0,199 simuliert. Zum Vergleich dient die äußerste Stufe, die einen einzelnen Besselstrahl darstellt (Abbildung 3.10a). Die einzelnen Stufen für die Simulation sind in Abbildung 3.10c farblich getrennt dargestellt. Die Fokuslänge der einzelnen Besselstrahlen sollte laut Gleichung (4.9) identisch sein. Die numerischen Aperturen NA_{max} der einzelnen Stufen sind in

Tabelle (3.1) aufgeführt.

Stufe	1	2	3	4	5
NA _{max}	0,0894	0,1262	0,1545	0,1782	0,1990

Tabelle 3.1.: NA_{max} der einzelnen Ringstufen.

Anhand der MTF in Abbildung (3.10d) wird deutlich, dass die Stufenlinse bei mäßig hohen Frequenzen (ca. $1 \frac{2\pi}{\mu\text{m}}$) einen höheren Kontrast aufweist als der Besselstrahl, der dafür zu der Maximalfrequenz hin langsamer abfällt. Dies deckt sich mit der direkten Beschreibung der Fokusse in Abbildungen (3.10a) und (3.10b). Durch die Normierung der MTF und PSF wird allerdings nicht deutlich, dass die Apertur der Stufenlinse 5 mal so groß ist und daher auch - zumindest bei einer Detektion - die Spitzenamplitude der Stufenlinse auch um einen Faktor 5, genauer gesagt 5,04, höher ausfällt, als bei einem gewöhnlichen Besselstrahl.

3.5.4. Spektraler Besselstrahl mit fs-Laser

Da die spektralen Eigenschaften einer kohärenten Lichtquelle in die Simulation einbezogen werden können, ist es möglich, einen fs-Fokus, der durch eine radiale Verteilung $k(\hat{r})$ der verschiedenen spektralen Moden in der hinteren Fokuspertur geformt wird, zu simulieren. Da diese Arbeit sich unter anderem auch mit länglichen Fokusverteilungen beschäftigt, wurde hier der Gedanke zu Grunde gelegt, dass eine Ebene im k-Vektorraum nach einer Fouriertransformation in eine unendlich lange und dünne Linie des Normalraums übergeht. Abbildung 3.11b zeigt die zu Abbildung 3.11a gehörige CTF. Für die Simulation wurde von einer homogen ausgeleuchteten Apertur ausgegangen. Die NA beträgt 0,4 und das Spektrum reicht von 779 nm bis zu 850 nm. Das Spektrum des spektralen Besselstrahls wurde mit der Formel

$$k(\hat{r}) = \frac{k_{\min}}{\cos \theta} = k_{\min} \frac{1}{\sqrt{1 - \sin^2 \theta}} = k_{\min} \frac{1}{\sqrt{1 - (\hat{r} \frac{\text{NA}}{n})^2}} \quad (3.43)$$

berechnet, wobei eine spektrale Restbreite von 10 % der gesamten spektralen Breite von 71 nm angesetzt wurde. Hierdurch wurde eine Ebene mit einer endlichen dicke generiert, die nach der Fouriertransformation zum Zeitpunkt null tatsächlich einen langen und scharfen Fokus ohne nennenswerte Nebenmaxima ergibt (Abbildung 3.11a). Die Phasen der einzelnen Moden bzw. Wellenlängen ändern sich allerdings auf Grund der unterschiedlichen Schwingungsperioden so, dass die Linie alle Stadien einer Defokussierung durchläuft (vgl. Abbildung. 3.11a). Der größte Unterschied zu einem Besselstrahlfokus liegt in der Gleichzeitigkeit, mit der die Spitzenintensität in der Linie zur Verfügung steht. Für das Spektrum der Vergleichssimulation wurden sowohl NA als auch das Spektrum identisch gewählt. Als Intensitätsverteilung für das Spektrum wurde wieder ein Hanning-Fenster gewählt. Dabei ergibt sich, dass die Spitzenintensität des Vergleichsfokus um den Faktor 10 höher ausfällt. Des Weiteren zeigt Abbildung 3.11c, dass der lange Fokus zum Zeitpunkt $t = 0$ eine bessere laterale

Auflösung als der Vergleichsfokus aufweist. Im zeitlichen Mittel jedoch nähert sich die MTF einem mit der Stufenlinse vergleichbaren Verhalten an (Abbildung 3.10d).

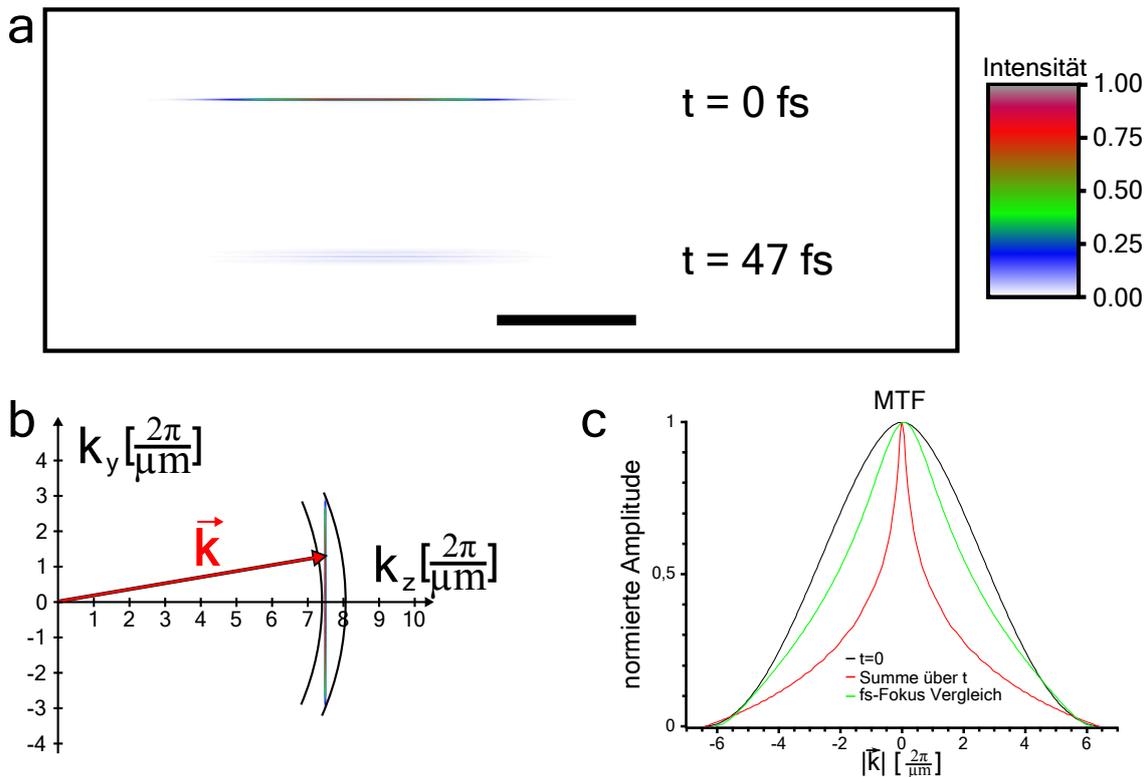


Abbildung 3.11.: Spektraler Besselstrahl mit einer NA von 0,4. Die Laserwellenlänge reicht von 779 nm bis 850 nm. Der Skalierungsbalken stellt $100 \mu\text{m}$ dar. (a) Fokus zum Zeitpunkt stärkster Fokussierung (0 fs) und leicht defokussiert 47 fs später. (b) Normierte Projektion der nach Gleichung (3.43) generierten CTF auf die $k_z - k_y$ -Ebene. (c) Normierte MTFs der Fokusebene zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ fs}$, gemittelt über einen Zeitraum von -500 fs bis $+500 \text{ fs}$ und als Vergleich von einem mit einer NA von 0,4 fokussierten fs-Laser bei konventioneller Ausleuchtung der hinteren Apertur.

3.5.5. Intrinsischer fs-Scanner

Statt die Moden radialsymmetrisch zu verteilen, kann das Spektrum auch linear in k über die hintere Apertur verteilt werden (Abbildung 3.12a). Hierdurch wird ein sehr schnell gescannter Fokus erzeugt. Gleichzeitig stellt dies die schnellste Scanmöglichkeit dar, die von frei propagierenden Lichtfeldern erreicht werden kann. Diese Art der Ausleuchtung wird auch als „zeitliches Fokussieren“ (aus dem Englischen: „temporal focusing“) bezeichnet [Oro05, Dan11].

In der Seitendarstellung ist sichtbar, dass der Fokus „schräg“ steht (Abbildung 3.12c). Das Licht propagiert allerdings immer noch in z -Richtung, wodurch das Lichtfeld die Fokalebene an jeweils unterschiedlichen Stellen durchquert. Daher wird in der Fokusebene die in Abbildung 3.12d dargestellte zeitliche Abhängigkeit erreicht.

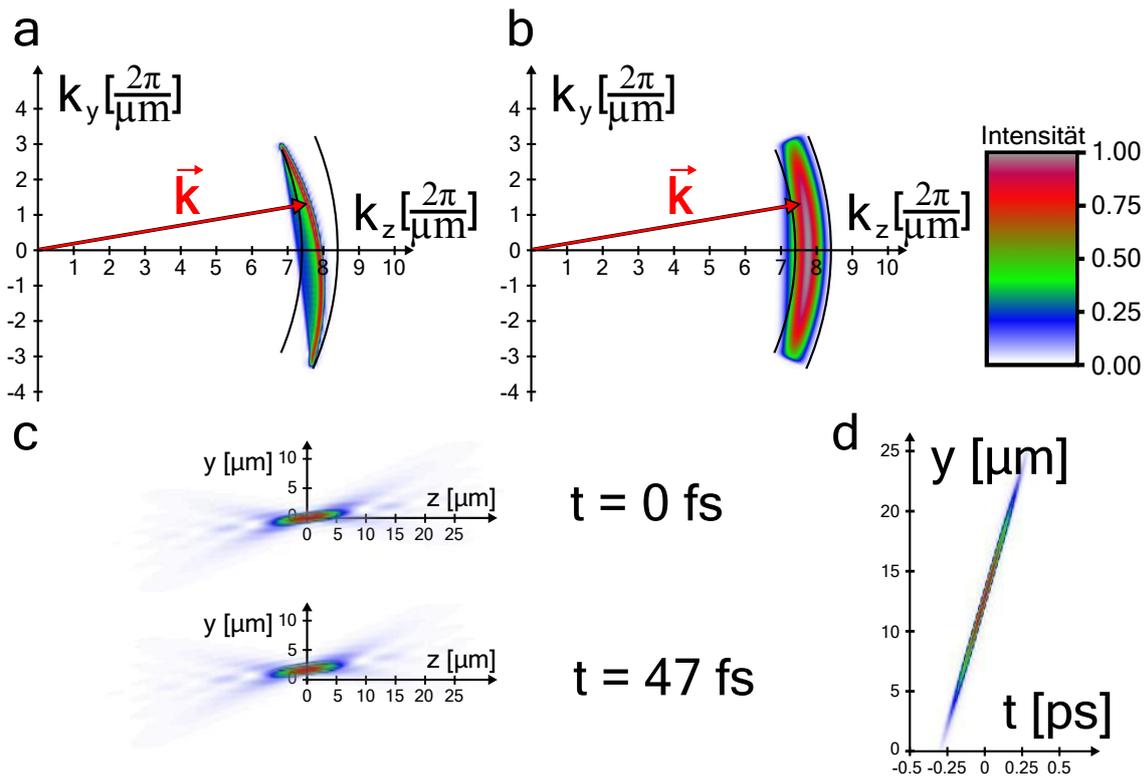


Abbildung 3.12.: Scannender Fokus. Simuliert bei einer NA von 0,4 und einem Spektrum von 750 nm bis 850 nm. (a) Normierte Projektion der über das Spektrum verkippten CTF auf die $k_z - k_y$ -Ebene. (b) Normierte Projektion der äquivalenten gewöhnlichen fs-Laser-CTF auf die $k_z - k_y$ -Ebene. (c) Der aus (a) resultierende Fokus zu zwei Zeitpunkten nahe dem eigentlichen Fokuspunkt. (d) Darstellung des Fokusscans auf der y -Achse über den Zeitraum t .

Das Spektrum erstreckt sich von 750 nm bis zu 850 nm, die spektrale Breite in jedem Punkt der hinteren Apertur beträgt 10 % hiervon und die NA des Objektivs wurde auf 0,4 festgelegt. Die Scangeschwindigkeit beträgt in diesem Fall $44,35 \frac{\mu\text{m}}{\text{ps}}$ ($= 0,148 c$). Zum Vergleich stellt Abbildung 3.12b die CTF eines gewöhnlichen fs-Fokus dar. Das Spektrum der Vergleichs-CTF liegt auch zwischen 750 nm und 850 nm, ist allerdings in jedem Punkt der hinteren Apertur identisch und besitzt die Intensitätsverteilung eines Hanning-Fensters. Die NA ist wiederum auf 0,4 festgelegt.

3.6. Diskussion

Es stellt sich heraus, dass die Nutzung der CTF in Kombination mit einer Fouriertransformation zur numerische Simulation von Fokusfeldern die Erschließung eines breiten Feldes an Simulationen ermöglicht.

Die hier durchgeführten Simulationen greifen bereits vorweg, dass in den folgenden Kapiteln eine erhöhte Tiefenschärfe und das scannen von Fokussen einen Schwerpunkt besitzt. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auch darauf verzichtet die

potentiellen Anwendungen der Simulationsergebnisse zu diskutieren. Statt dessen wird die Methodik und deren Eigenschaften genauer analysiert.

Als Referenz hierfür kann der übliche Ansatz der Fourieroptik hinzugezogen werden. Dieser kann mit den entsprechenden Phasenmasken auch genutzt werden, die dreidimensionale Fokusverteilung zu ermitteln. Allerdings steigt der Aufwand bei nicht monochromatischen Lichtquellen noch weiter an, so dass eine drei bzw. vierdimensionale Fouriertransformation dem vorgezogen werden sollte. Abgesehen hiervon kann durch die Dimensionsreduktion (Abschnitt 3.3) die gewöhnliche Fourieroptik abgeleitet und auf jede beliebige Schnittebene angepasst werden. Anders ausgedrückt stellt die Fourieroptik einen Spezialfall des hier entwickelten Verfahrens dar, der in der endgültigen Simulationssoftware durch das deaktivieren einer Dimension automatisch erzielt wird. Dieses Vorgehen wird in der Entwicklung als „top down“ bezeichnet und ist in der endgültigen Implementierung polychromatischer Simulationen gegenüber der Fourieroptik zu bevorzugen. Simulationsansätze, die die Maxwell-Gleichungen statt der mit Einschränkungen behafteten Wellengleichung numerisch lösen, sind in der Lage weitaus komplexere Situationen zu erfassen [Yee66, Bal08]. Hierzu zählen z.B. Absorptionseffekte, Reflexionen und Brechung. Dies rechtfertigen allerdings nicht den Aufwand um die Beschreibung der Fernfeldmikroskopie zu ermöglichen.

Als Alternative zu der FFT in Kombination mit einer geeigneten Interpolationsmethode bietet sich auch die Nutzung einer nicht äquidistant abgetasteten DFT an. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass der Rechenaufwand mit $m \cdot o$ statt $m \cdot \log_2 m$ ansteigt. m repräsentiert hierbei die Anzahl der Zielwerte des Simulationsvolumens, o die Anzahl der Stützstellen der CTF. Bei üblichen n von $> 512^3$ und m von $> 10^4$ benötigt die FFT um den Faktor $\frac{m}{m} \cdot \frac{o}{\log_2 m^3} = \frac{10000}{3 \log_2 512} = \frac{10000}{27} = 370$ weniger Operationen gegenüber der DFT. Dies rechtfertigt die Kombination der FFT⁸ mit einer Interpolationsmethode für Interpolationskernel deren Größe diesen Geschwindigkeitsvorteil nicht überschreitet. Diese Problemstellung wird in einem anderen Zusammenhang auch in Kapitel 5 wieder aufgegriffen.

Der Vergleich der Interpolationsmethoden zeigt, dass die B-Spline-Methode einen guten Kompromiss zwischen Geschwindigkeit und Simulationsqualität darstellt, wenn der Rechenaufwand minimal gehalten werden soll. Sonst bietet die skalierte und gefensterter sinc-Interpolation die beste Interpolationsqualität, die zudem über die frei wählbare Kernelgröße und Fensterung in ihren Eigenschaften speziellen Problemen angepasst werden kann.

Aus Kapitel 2 lässt sich schlussfolgern, dass auch die Simulation von doppelbrechenden und dispersiven Medien möglich ist. Da diese Aspekte in dieser Arbeit allerdings eine geringe Relevanz besitzen, wurde darauf verzichtet, diese Möglichkeiten mit der Simulation zu erschließen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die numerische Implementierung der elektromagnetischen Wellengleichung mittels FFT und skaliertes und gefensterter sinc-Interpolation alle Anforderungen erfüllt, um für die praktische Anwendung hinreichend genaue Simulation von Fernfeldmikroskopen bzw. deren Kombination aus Lichtquelle und Optik zu liefern.

⁸In dieser Arbeit wurde das FFTW-Paket für C++ eingesetzt.

4. Optische Projektionstomographie

Optische Projektionstomographie (OPT) ist eine Technik, die sich hervorragend eignet, um die beiden vorigen Kapitel 2 und 3 auf eine reale Problemstellung anzuwenden. Sowohl Auflösung als auch Empfindlichkeit liegen deutlich unterhalb der Leistungsfähigkeit von Systemen, mit denen OPT verglichen werden kann. Dennoch bietet diese Technik Vorteile hinsichtlich des Sichtfeldes und der dreidimensionalen Darstellung von Streuung und Absorption. Hierdurch werden Experimente ermöglicht, die zu diesem Zeitpunkt mit keiner weiteren Technik durchgeführt werden können. [Sha02, Sha03b, Sha04, Rie11, McG11]

Inhalt

4.1. Ursprünge	60
4.1.1. Radontransformation	60
4.1.2. Computertomographie (CT)	61
4.2. Optischer Projektionstomograph	62
4.2.1. Aufbau	63
4.2.2. Prozedur	64
4.3. Auflösungsoptimierung	65
4.3.1. Ringapertur	66
4.3.2. Streulicht- und Transmissionsausleuchtung	66
4.3.3. 2D-MTF der xy-Ebene über verschiedene Tiefen	68
4.4. Diskussion	71

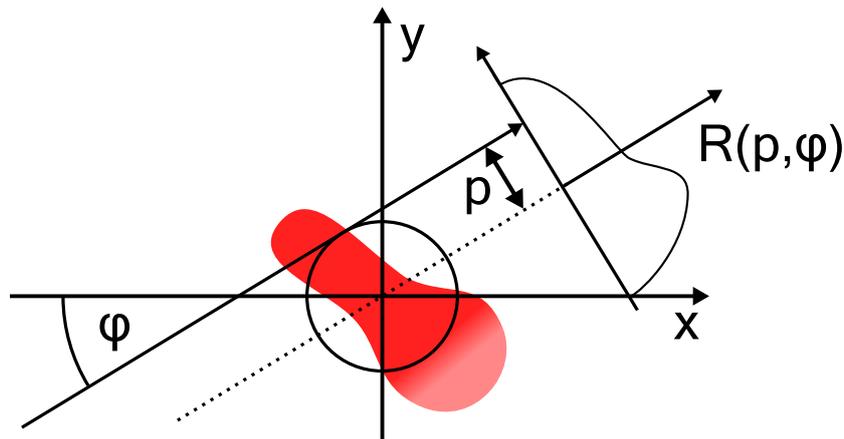


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der Radontransformation. Eine zweidimensionale Funktion (rot dargestellt) wird entlang einer Tangente zu dem Kreis mit dem Radius p und dem Winkel φ zur y -Achse aufintegriert und so in die Radontransformierte $R(p, \varphi)$ überführt.

4.1. Ursprünge

Die mathematischen Grundlagen der Computertomographie und damit auch der OPT, wurden 1917 von Johann Radon veröffentlicht [Rad17]. Jedoch erst die Fortschritte in der Computertechnik erlaubten die Auswertung von Röntgendaten unter Anwendung dieser Transformation im Jahre 1973 [Hou73].

4.1.1. Radontransformation

Die Radontransformation ist eine mathematische Beschreibung der Integration entlang einer Kurvenschar, die unter gewissen Bedingungen geeignet ist, um auf die ursprünglich aufintegrierten Werte zurückzuschließen. Die zweidimensionale Transformation der reellen Funktion $f(x, y)$ zu $R(p, \varphi)$ ist gegeben durch [Rad17]:

$$R(p, \varphi) = R(-p, \varphi + \pi) = \int_{-\infty}^{\infty} ds f(p \cos \varphi - s \sin \varphi, p \sin \varphi + s \cos \varphi) \quad (4.1)$$

Hierbei ist φ der Winkel zwischen der x -Achse und der Geraden, die eine Tangente zu dem Kreis mit dem Radius $p = x \cos \varphi + y \sin \varphi$ um den Ursprung bildet (Abbildung 4.1). Um die Transformation zu invertieren, wird zunächst eine Integration durchgeführt, die der später erläuterten Rückprojektion ähnelt. Das Zwischenprodukt ist von der Zielkoordinate (x, y) und dem Abstand q zu dieser abhängig:

$$\tilde{f}(x, y, q) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi R(x \cos \varphi + y \sin \varphi + q, \varphi) \quad (4.2)$$

Für die Invertierung der Transformationen muss noch der Parameter q eliminiert

werden [Rad17]:

$$f(x, y) = -\frac{1}{\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) \quad (4.3)$$

Diese Transformation und deren Umkehrung sind eindeutig und werden im Detail in Kapitel 5 bearbeitet.

4.1.2. Computertomographie (CT)

Ursprünglich wurde die Radontransformation in der Bildgebung eingeführt, um aus den in der Röntgenbildgebung üblichen Transmissionsaufnahmen mehr Informationen für die Diagnose zu gewinnen. Die Wichtigkeit dieses Vorgehens für die Medizin wird durch die Vergabe des Medizinnobelpreises an Godfrey N. Hounsfield und Allan M. Cormack für deren maßgebliche Entwicklungsarbeit deutlich [All11]. Um die Analogien und die Unterschiede zu dem optischen Pendant, der OPT, besser hervorzuheben, wird hier kurz der Aufbau und die physikalische Funktionsweise eines Computertomographen erläutert.

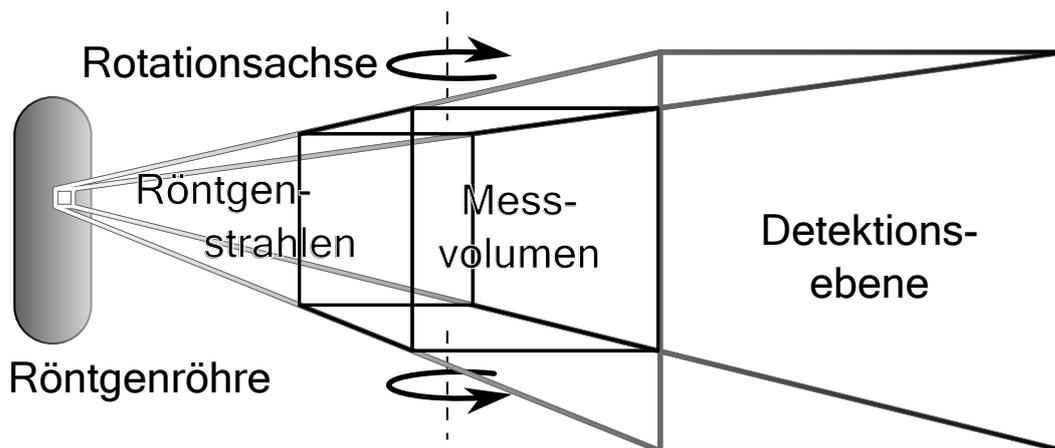


Abbildung 4.2.: Elementare Darstellung eines “cone beam” Computertomographen. Eine Röntgenröhre sendet kegelförmig Röntgenstrahlung aus, die die Probenkammer und damit auch die Probe durchleuchtet. Die transmittierte Röntgenstrahlung wird in der Detektionsebene gemessen. Um genügend viele Blickwinkel zu erhalten, ist die Probe oder auch der Aufbau drehbar.

In Ermangelung an qualitativ relevanten Optiken für Röntgenstrahlung kann eine einfache geometrische Erklärung gewählt werden (Abbildung 4.2). Eine Röntgenquelle emittiert Röntgenstrahlung, die auf geraden Linien durch das Messobjekt propagiert. Die Röntgenquanten, die die Messplatte noch erreichen, werden dort von einem Flächenarraydetektor registriert und generieren auf diese Weise ein Transmissionsbild. Nun wird um eine festgelegte Rotationsachse, die möglichst senkrecht auf der

Strahlungsrichtung steht, das Objekt oder der Apparat gedreht, um die Aufnahme bei weiteren Winkeln zu wiederholen. Auf diese Weise wird eine der Radontransformation ähnliche Operation physikalisch umgesetzt. Dies erlaubt es, die physikalische Operation mathematisch umzukehren und auf das Objekt zurückzuschließen.

Der allgemeine Fall einer Projektion in der CT ist ein sogenannter “cone beam” (“Kegelstrahl”). Es gibt Bemühungen die Röntgenstrahlen in ein oder zwei Dimensionen zu parallelisieren. Dies ist, ohne Optiken, allerdings mit Verlusten in der Strahlungsleistung verbunden, die die Aufnahmedauer erheblich verlängern können. Hierbei ergeben sich die beiden weiteren Betriebsarten “fan beam” (“Fächerstrahl”), in dem die Strahlen in Richtung der Rotationsachse parallel sind und “parallel beam” (“Parallelstrahl”), bei dem alle Strahlen parallel sind und der damit der ursprünglichen Radontransformation am ehesten entspricht. Dies vereinfacht und verkürzt die weitere Verarbeitung der notwendigen Computerrekonstruktion.

Um aus den Röntgentransmissionsbildern die Absorption der Probe zu bestimmen, ist es nötig das Lambert-Beersche Gesetz aus Gleichung (2.51) mit der Radontransformation (4.1) zu verknüpfen. Das Modell zur Abschwächung durch eine dreidimensionale Probe bzw. eines vom Ort abhängigen Extinktionskoeffizienten $\epsilon(x, y)$ lautet somit:

$$I(p, \varphi) = I_0 e^{-\int_{-\infty}^{\infty} ds \epsilon(p \cos \varphi - s \sin \varphi, p \sin \varphi + s \cos \varphi)} \quad (4.4)$$

$$= I_0 e^{-R_\epsilon(p, \varphi)} \quad (4.5)$$

Durch den negativen Logarithmus der detektierten Intensität $I(p, \varphi)$ kann somit die invertierbare Radontransformierte $R_\epsilon(p, \varphi)$ ermittelt werden:

$$R_\epsilon(p, \varphi) = \ln(I_0) - \ln(I(p, \varphi)) \quad (4.6)$$

und damit auch der orts-, bzw. materialabhängige Extinktionskoeffizienten $\epsilon(x, y)$.

4.2. Optischer Projektionstomograph

Der erste optische Projektionstomograph wurde von James Sharpe *et al.* [Sha02] im Jahr 2002 gebaut. Dies ist zunächst erstaunlich, da die Computertomographie bereits 30 Jahre lang bekannt war und die Schwierigkeiten, die die Röntgenstrahlung birgt, in der Optik leicht zu überwinden sind. Im Prinzip sind die Röntgenaufnahmen lediglich durch Schattenaufnahmen, die mit Licht erzeugt werden, zu substituieren. Eine Erklärung für die späte Umsetzung der OPT ist die Entwicklung in der Computertechnik und parallel entstandener Verfahren, die ähnliche Informationen liefern. Im Jahr 2002 war es möglich, mit einem vergleichsweise günstigen PC die rechenaufwendige Computerrekonstruktion mit einer Auflösung, die in der Mikroskopie üblich ist, zu gewährleisten [Sha02]. Röntgencomputertomographen, die zuvor gebaut wurden, griffen meist auf Spezialhardware zurück [Hou73, Li05, Buz08]. Die Kosten für solche Hardware überstiegen die für gewöhnliche Mikroskope, was selbst den vergleichsweise günstigen optischen Aufbau nicht rechtfertigte [Bea94, Klo00].

Dieser Aspekt ist von Interesse, da er zeigt, dass es sich bei der optischen Projektionstomographie (OPT) um ein Werkzeug handelt, mit dem zwar Experimente durchgeführt werden können, die aber auch in ihrer Wirtschaftlichkeit mit anderen Verfahren konkurrieren muss.

4.2.1. Aufbau

Ein optischer Projektionstomograph besteht in seiner einfachsten Form aus einer Lichtquelle, die eine rotierbare Probe durchleuchtet. Diese Probe wird dann mit einem Objektiv auf einen Kamerachip abgebildet. Die schematische Darstellung in Abbildung 4.3 zeigt die einzelnen Elemente, die hierfür notwendig sind. Eine Lichtquelle, für die Halogen- sowie Dampfdrucklampen oder auch Leuchtdioden in Frage kommen, wird mit einem Diffusor homogenisiert.

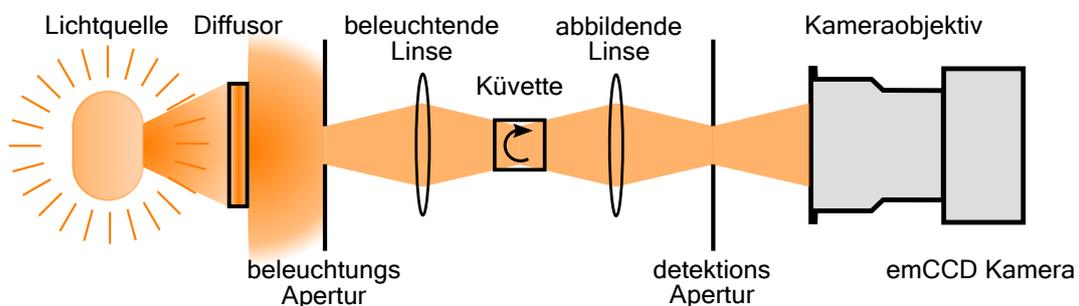


Abbildung 4.3.: Schematische Darstellung eines optischen Projektionstomographen. Das Licht einer Lichtquelle wird mit einem Diffusor homogenisiert. Das so homogenisierte Licht wird in seiner Apertur mit einer Blende begrenzt, über eine Linse abgebildet und durchquert das Probenvolumen, in dem sich eine Küvette mit planen Austrittsfenstern befindet. In der Küvette befindet sich die an einem Rotationstisch befestigte Probe. Der umgebende Brechungsindex ist an die Probe mit einer Flüssigkeit angepasst. Das transmittierte Licht wird durch eine telezentrische Optik bestehend aus einer Linse, einer Blende und einem Kameraobjektiv auf den Detektionschip abgebildet. Die Abbildung entspricht der eines "parallel beam" Computertomographen. emCCD: „electron multiplying Charge-Coupled Device“

Dieser wird mit einer Apertur in seinem Durchmesser beschränkt. Das homogenisierte Licht wird dann mit einer Linse in die Küvette fokussiert. Der Diffusor ist notwendig, um eine homogene Hintergrundbeleuchtung über die gesamte Probentiefe hinweg zu ermöglichen. Die Probe selbst ist in einer transparenten Befestigung oder an einer nicht zu beobachtenden Stelle fixiert, um sie rotieren zu können. Zur Minimierung von Brechungseffekten, die in der Radontransformation nicht berücksichtigt werden, wird die Probe in einer dem Brechungsindex angepassten Flüssigkeit untergebracht, die z. B. die gesamte Kapillare, in der sich die Probe befindet, ausfüllt. Des Weiteren befindet sich dieses Gebilde wiederum in einer rechteckigen Küvette, die ih-

rerseits mit einer dem Brechungsindex anpassenden Flüssigkeit gefüllt ist (Abbildung 4.3). Dies ist notwendig, um ein planes Austrittsfenster zu erhalten, da der weitere Strahlverlauf in Luft stattfindet. Das Objekt wird nun von einer telezentrischen Optik, die z.B. durch eine Linse, eine Blende und ein Kameraobjektiv gebildet wird, auf den Kamerachip abgebildet. Hierfür liegt das Objekt im Fokus der ersten Linse, bei der es sich um einen asphärischen Achromat¹ mit einer Brennweite von 30 mm handelt. Die Blende befindet sich in der hinteren Fokusebene. So entsteht ein Bild in der Fokusebene des Kameraobjektivs², das das Objekt unabhängig von dessen Abstand zur Fokusebene immer gleich groß darstellt. In der Detektionsebene kommt eine emCCD-Kamera (Andor LucaR) zum Einsatz.

Neben der Durchleuchtung des Objektes erlaubt der Einsatz von Licht auch andere Wechselwirkungsmechanismen als die Absorption bzw. Extinktion (Absorptionsverluste + Streuverluste) zu nutzen. Wird zu der Blende noch ein Bandpass- oder Hochpassfilter, der z.B. Fluoreszenzlicht von Anregungslicht trennt, hinzugefügt, kann auch Fluoreszenz detektiert werden. Wird die Probe zudem nicht in Sichtrichtung sondern z.B. senkrecht hierzu beleuchtet, kann auch die Streuung an der Probe genutzt werden. Auf mögliche Wechselwirkungsmechanismen wird im Detail in Kapitel 6 eingegangen.

4.2.2. Prozedur

Soll eine Probe mit einem OPT-Aufbau untersucht werden, ist zunächst sicherzustellen, dass die Probe genügend transmittiv ist und in der brechungsindexanpassenden Flüssigkeit gehalten werden kann. Streut die Probe zu stark, muss sie optisch aufgeklärt werden, worauf in Abschnitt 6.3 eingegangen wird. Falls während des Aufklarens noch nicht geschehen, wird die Probe nun in ihre endgültige Flüssigkeit überführt. Die Probe kann nun an ihrer Halterung befestigt oder in die umschließende Röhre hineingesaugt werden. Bei kleinen Proben wird üblicherweise eine Glaskapillare verwendet, die an Ober- und Unterseite mit Wachs bzw. Knete und Sekundenkleber versiegelt wird. Diese Kapillare wird daraufhin an der Rotationseinheit³ fixiert und in die mit Glycerin als brechungsindexanpassender Flüssigkeit gefüllte Küvette abgesenkt. Dort müssen nun alle mechanischen Bedingungen für den Ablauf erfüllt sein. Dies kann durch eine entsprechend genaue Fertigung oder eine manuelle Justierung gewährleistet werden. Das Rotationszentrum muss sich innerhalb der Probe befinden und senkrecht zur optischen Achse stehen, da die Probe sonst die Fokusebene während einer Rotation verlassen würde. Weiterhin ist die gesamte Probe scharf abzubilden. Da jede Probe unterschiedlich groß ist und die Tiefenschärfe von der Apertur abhängt, muss die Apertur klein genug gewählt werden, um mindestens das halbe Objekt scharf abzubilden [Wal07]. Auf Grund der Bildfeldhebung ist die Position der scharf abbildenden Fokusebene [Hel93, Paw06] abhängig von dem Brechungsindex der Flüssigkeit in der Küvette. Bevor die Aufnahme gestartet werden

¹Edmund Optics: NT49-662

²Sigma DG 28-300mm 1:3,5-6,3

³Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG; M-060.PD

kann, müssen noch die Belichtungseigenschaften korrekt eingestellt werden. Zum einen sollte die Kamera in keiner der Projektionen eine Sättigung aufweisen, zum anderen dürfen die Aufnahmen auch nicht zu lichtschwach sein, um genügend Signal und damit Informationen zu gewinnen. Nach der Aufnahme werden die so erhaltenen Rohdaten rekonstruiert. Die Variationsmöglichkeiten bei der Rekonstruktion und deren Ergebnisse werden in Kapitel 5 behandelt.

4.3. Auflösungsoptimierung

Die Auflösung der optischen Projektionstomographie ist abhängig von der Probengröße [Lor10a]. Dies hängt damit zusammen, dass mindestens die halbe Probe innerhalb der Tiefenschärfe liegen muss. Ansonsten werden Randbereiche oder das Zentrum nicht mehr korrekt aufgelöst. Aus den Formeln (2.42) und (2.43) lässt sich die Beziehung zwischen Probengröße und Auflösung, die über die numerische Apertur (NA) zusammenhängen, herleiten.

$$\left. \begin{aligned} \Delta z &= \frac{8,48n(\Delta x)^2}{\lambda} \\ \Delta x &= \sqrt{\frac{\lambda \Delta z}{8,48n}} \end{aligned} \right\} \frac{\Delta z}{\Delta x} = \frac{8,48n\Delta x}{\lambda} = \frac{4,24n}{\text{NA}} \quad (4.7)$$

Das Verhältnis zwischen Objektgröße und zugehöriger Auflösung $M = \frac{\Delta z}{\Delta x}$ zeigt, dass mit abnehmender Auflösung bzw. zunehmender Objektgröße die Gesamtzahl der signifikanten Messpunkte M ansteigt (vgl. „Auflösung und Sichtfeld“ in Unterabschnitt 2.5.1). Dieser Zusammenhang folgt auch aus der CTF (Abbildung 2.2a) und MTF (Abbildung 4.7a). Die CTF ist hier ein Teil einer Kugelschale (siehe Abschnitt 2.3.2), die in x-, y- und z-Richtung eine Ausdehnung besitzt. Soll nun die Tiefenschärfe möglichst groß werden, dürfen keine Details mehr in z-Richtung aufgelöst werden. Daher wird die Ausleuchtung reduziert, um die Gebiete mit größerer Steigung in z-Richtung nicht zu nutzen. Das Verhältnis

$$\frac{\Delta k_{xy}}{\Delta k_z} = \frac{|\vec{k}| 2 \frac{\text{NA}}{n}}{|\vec{k}| (1 - \sqrt{1 - (\frac{\text{NA}}{n})^2})} \approx \frac{2 \frac{\text{NA}}{n}}{1 - 1 + \frac{1}{2} (\frac{\text{NA}}{n})^2} = \frac{4n}{\text{NA}} \quad (4.8)$$

ist bis auf einen Faktor mit dem aus Gleichung (4.7) identisch. Die MTF verdeutlicht den Effekt, den man beim Überschreiten der Tiefenschärfe erhält. Hierbei wird die MTF der xy-Ebene für verschiedene z-Positionen dargestellt (Abbildung 4.7). Deutlich ist die Einschnürung der MTF zu größeren z-Abständen hin sichtbar. Ein Nulldurchgang bedeutet, dass die dortige Bildfrequenz nicht mehr abgebildet werden kann. Zusätzlich existieren allerdings auch Bereiche negativer Phase (weiße Bereiche in Abbildung 4.7), die korrekt integrierte Signale wieder auszulöschen vermögen (vgl. Abschnitt 4.3.3).

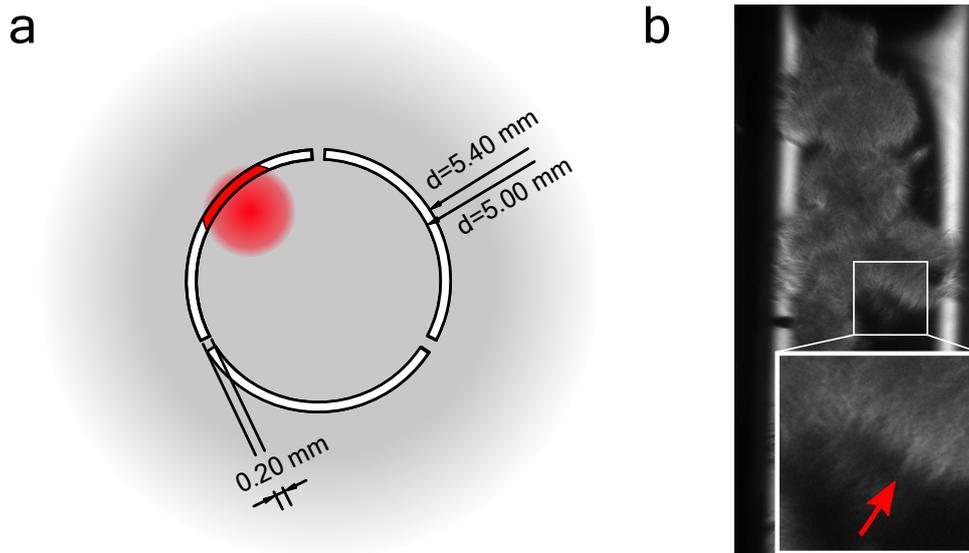


Abbildung 4.4.: Streulicht mit Ringapertur. (a) Technische Zeichnung der genutzten Ringblende. Der rote Fleck stellt die unvollständige Ausleuchtung durch Streulicht dar. (b) Streulichtaufnahme an einer Ganglienkeette der *Locusta migratoria* bei geringer Beleuchtungsapertur, mit der Ringblende aus (a). Der Rote Pfeil zeigt auf eine deutliche Ausprägung des „Linieneffekts“.

4.3.1. Ringapertur

Gleichung (4.8) zeigt, dass die Anzahl der signifikanten Bildpunkte stark von der Geometrie der CTF abhängt. Neben Ansätzen, die Phase zu beeinflussen, ist das Nächstliegende die Einschränkung der Ausleuchtung auf einen Ring. Hierdurch wird Δk_{xy} nicht beeinflusst, Δk_z kann jedoch reduziert werden (vgl. Abbildung 2.2). Die Anzahl der signifikanten Bildpunkte muss dementsprechend ansteigen. Durch diese Ausleuchtungsart entsteht ein Besselstrahl [Dur87, Lor10a]. Abbildungen 3.10a und 3.10d zeigen beispielhaft einen solchen Strahl und dessen MTF. Durch Näherung und Anwendung des Rayleigh-Kriteriums (der Abfall der Intensität auf 36 % [Lor10a]) kann Formel (2.43) in

$$\Delta z = \frac{2.12n\lambda}{NA_{\text{Außen}}^2 - NA_{\text{Innen}}^2} \quad (4.9)$$

überführt werden [Lor10a]. Hierbei beschreibt $NA_{\text{Außen}}$ die ausgeleuchtete NA und NA_{Innen} die innere, blockierte NA des Ringes.

4.3.2. Streulicht- und Transmissionsausleuchtung

Soll das Prinzip der Ringapertur auf die OPT übertragen werden, ist es zwingend notwendig, dass sie in den bildgebenden Strahlengang integriert wird. Die Ringapertur ist an Stelle der gewöhnlichen Apertur zwischen der Linse und dem Objektiv in Abbildung 4.3 zu platzieren. Auf Grund der niedrigen Effizienz bzw. Empfindlichkeit bei der emissions-OPT (vgl. Unterabschnitt 6.2.1) wurde diese nicht mit der Ring-

blende kombiniert. Statt dessen wurde das Verhalten des Systems bei Streulicht- und Transmissionsaufnahmen untersucht.

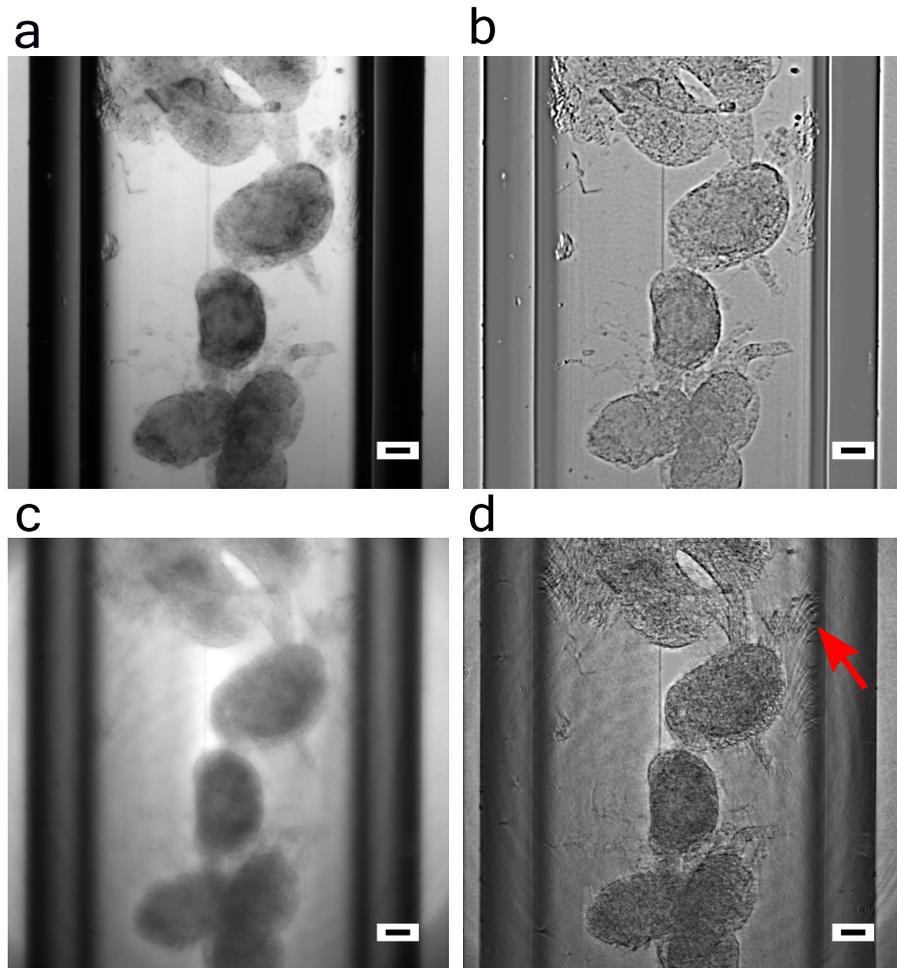


Abbildung 4.5.: Transmissionsaufnahmen der Ganglienkette einer *Locusta migratoria* [Lor10a]. Die schwarzen Skalierungsbalken entsprechen 100 μm . (a) Aufnahme mit 2,2 mm großer Apertur. (b) Wie (a) allerdings mit einer frequenzbasierten Normierung (ImageJ [MA04, Bur07]: „Unsharp Mask“: Radius (Sigma) = 5.0; Mask Weight = 0.95). (c) Aufnahme mit der Ringblende aus Abbildung 4.4a. (d) Wie (c) allerdings mit einer frequenzbasierten Normierung (ImageJ [MA04, Bur07]: „Unsharp Mask“): Radius (Sigma) = 5.0; Mask Weight = 0.95). Der rote Pfeil zeigt auf „Strichartefakte“.

Abbildung 4.4a zeigt die für die Messungen erzeugte Blende. Es handelt sich um ein Blech, das mit einem Laserschnittprozess am Laser Zentrum Hannover (LZH) hergestellt wurde. Die Blende dient dazu, in den Detektionspfad eingesetzt zu werden, um dort die Auflösung bei gleichbleibender Tiefenschärfe zu erhöhen. Soll nun Streulicht detektiert werden, kann z.B. die beleuchtende Apertur so weit eingeschränkt werden, dass bei gerader Transmission das Licht in der Mitte der

Blende blockiert wird. Nur durch die Ablenkung oder Streuung des Lichts, so dass Licht auf die Öffnung des Rings fällt, kann ein Signal erzeugt werden. Wird die Ausleuchtung zu klein gewählt, entsteht der in Abbildung 4.4b dargestellte Effekt. Als wahrscheinlichste Erklärung kann die rote Markierung in Abbildung 4.4a dienen:

Wird das Licht durch Brechung abgelenkt oder durch Streuung tendenziell nur in einer Richtung verbreitert, ist dadurch lediglich ein Teil der Ringblende ausgeleuchtet. Dies stellt eine stark asymmetrische Apertur dar, die nach der Abbildung auf den Detektor einen Strich bzw. Streifen erzeugt. Da der Streifen richtungsabhängig ist, geht zwar die Bildinformation verloren, jedoch wird bis auf das Vorzeichen die Richtung der Ablenkung im Bild wiedergegeben. Daher sind in Abbildung 4.4b die Striche tendenziell senkrecht zu den Objektoberflächen (beispielhaft mit rotem Pfeil hervorgerufen).

Die Brechung an der Kapillare wird bei dieser Beleuchtungsart sehr deutlich hervorgehoben und verhindert hierdurch die Erhöhung der beleuchtenden NA, um den Linieneffekt zu minimieren. Durch die Veränderung der Beleuchtungsparameter tritt zunehmend mehr Hintergrundlicht auf, welches die Streulichtmessung in eine Transmissionsmessung überführt. Wird die beleuchtende Apertur weiter vergrößert, bewirkt dies eine Transmissionsausleuchtung, wie sie in Abbildung 4.5c zu sehen ist. Zum Vergleich ist in Abbildung 4.5a ein herkömmliches Transmissionsbild dargestellt. Der deutliche Kontrastverlust kann nachträglich über numerische Filter kompensiert werden. Für Abbildungen 4.5b und 4.5d wurde hierfür der mit dem durch einen empirischen Faktor von 0,95 gewichtete niederfrequente Hintergrund subtrahiert⁴. An den Wandungen der Kapillare zeigen sich für eine Ringblende wieder Streifen (roter Pfeil Abbildung 4.5d), was erneut auf Abschattungseffekte, wie z.B. durch Totalreflexion zurückschließen lässt. Obwohl die Aufnahmen sich rekonstruieren lassen, ist der Informationsgewinn bei dieser Probe hauptsächlich auf dessen Oberfläche beschränkt [Lor10a].

4.3.3. 2D-MTF der xy-Ebene über verschiedene Tiefen

Um den theoretischen Einfluss der Ringblende auf die Auflösung zu bestätigen, wurden Messungen an einem Auflösungstestobjekt nach dem "1951 USAF"-Standard (USAF Hi-Res Target, Edmund Optics GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt (siehe Abbildung 4.6)⁵. Dies erlaubt es, die nach der in Kapitel 3 beschriebenen Methodik simulierten MTF mit dem realen System zu vergleichen. Hierfür wurde auf Grund der Messmethode die MTF an unterschiedlichen Abständen zur Fokusebene lediglich in lateraler Richtung bestimmt. Die Simulation wurde dementsprechend angepasst.

Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Zunächst kann festgehalten werden, dass die Simulationen (Abbildungen 4.7a und 4.7c) und die zugehörigen Transmissionsmessungen (Abbildungen 4.7b und 4.7d) eine starke Ähnlichkeit aufweisen. Besonders fällt auf, dass bei zunehmendem Versatz in

⁴ImageJ [MA04, Bur07] „Unsharp Mask“: Radius (Sigma) = 5.0; Mask Weight = 0.95

⁵Eine Tabelle mit den Definitionen der einzelnen Strichgruppen ist in Anhang C zu finden.

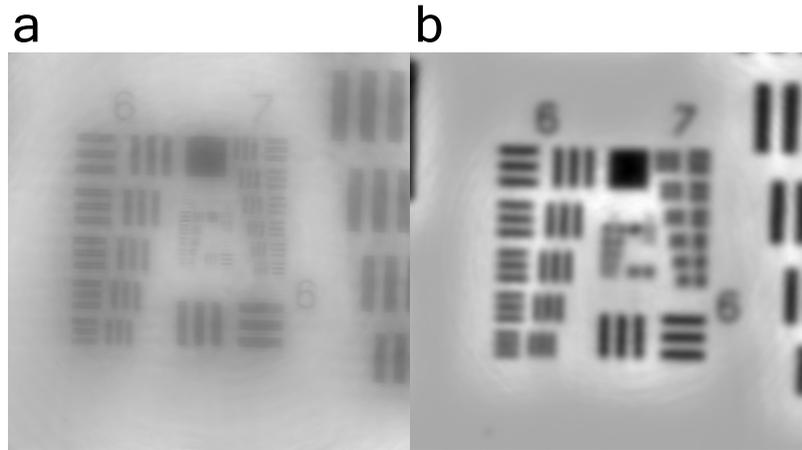


Abbildung 4.6.: Beispielhafte Darstellung des 1951 USAF Target mit dem die MTF des Systems gemessen wurde. (a) Aufnahme mit der Ringblende aus Abbildung 4.4a. (b) Aufnahme mit der 2,2 mm großen Apertur.

axialer (z -)Richtung negative Werte auftreten, die durch deren farblose bzw. weiße Darstellung hervorgehoben wurden. Bei der üblichen Apertur (Abbildungen 4.7a und 4.7b) weist dieser Phasensprung auch noch ein starke Abhängigkeit von der Bildfrequenz auf. Sollte hieraus eine Fokuslänge abgeleitet werden, ist somit das erste Auftreten einer negativen Phase als Grenze zu wählen. Sonst ist es möglich, dass sich Bildelemente gleicher Frequenz aber unterschiedlicher axialer Position gegenseitig aufheben.

Weiterhin ist ersichtlich, dass die Grenzfrequenzen der gemessenen und simulierten MTF miteinander übereinstimmen. Somit erlaubt die Simulation auch die Bestimmung der maximal erreichbaren Auflösung. Das Einbringen der Ringblende in das System bringt demnach eine Auflösungserhöhung um einen Faktor von $2,5 \pm 0,06$ [Lor10a]. Dies geht mit einem starken Kontrastverlust einher, der sich in einem frühen Abfallen der MTF der Ringblende äußert und auch in Abbildung 4.6a deutlich zu erkennen ist. Werden die MTF der beiden Messungen zueinander ins Verhältnis gesetzt, kann der tatsächliche Kontrastverlust gegenüber der Apertur quantifiziert werden (Abbildung 4.7e). Die Darstellung zeigt das Kontrastverhältnis der MTF der Fokusebenen. Es wird deutlich, dass mit zunehmender Bildfrequenz der Besselstrahl stark an Kontrast gegenüber dem Standardfokus einbüßt. Das theoretische Verhältnis fällt auf 16 %, das gemessene Verhältnis auf 8 % ab, bevor die MTF des normalen Fokus oberhalb von $113 \pm 2 \frac{\text{lp}}{\text{mm}}$ ($\approx 2^{6,8} \frac{\text{lp}}{\text{mm}}$)⁶ auf null absinkt und das Verhältnis gegen unendlich strebt. Mit Gleichung (2.45) kann somit auf die maximale Restempfindlichkeit RE_{max} geschlossen werden. Das Systemrauschen sei hierfür auf eins normiert:

$$RE_{\text{max}} = \frac{\text{SNR}_{\text{Signal}}^2}{\text{SNR}_{\text{Systemhintergrund}}^2 + \text{SNR}_{\text{Signal}}^2} = \frac{0,16^2}{(0,16^2 + 0,84^2)} = 0,035$$

⁶ $\frac{\text{lp}}{\text{mm}}$ =Linienpaare pro Millimeter

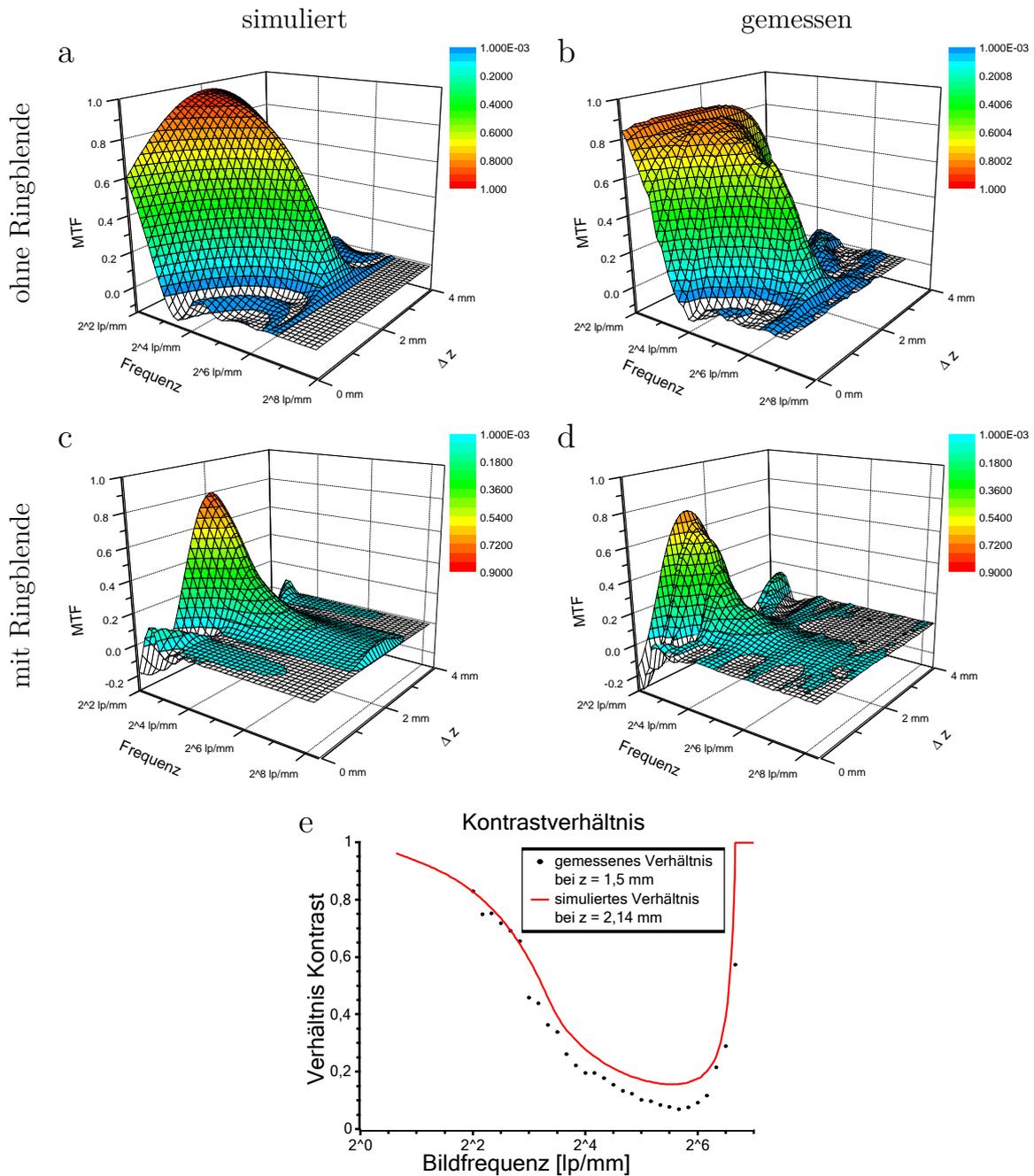


Abbildung 4.7.: (a-d) Dreidimensionale Darstellung einer Schar von 2d-MTF. Aufgetragen ist der Kontrast (MTF) über die Bildfrequenz in Linienpaaren pro Millimeter (lp/mm) für mehrere Positionen entlang der optischen (z-) Achse über eine Tiefe von 4 mm [Lor10a]. (a) Simuliertes Verhalten des Systems mit 2,2 mm Apertur. (b) Gemessenes Verhalten des Systems mit 2,2 mm Apertur. (c) Simuliertes Verhalten des Systems mit der Ringblende aus Abbildung 4.4a. (d) Gemessenes Verhalten des Systems mit der Ringblende aus Abbildung 4.4a. (e) Gemessene und simulierte Verhältnisse des Systems zwischen der Ringblende und der Apertur aus den vorigen Darstellungen in der Fokusebene.

4.4. Diskussion

Arbeiten mit der optischen Projektionstomographie wurden 2002 zum ersten mal von James Sharpe *et al.* [Sha02] veröffentlicht. Die OPT erfüllt bis heute die Nische zur dreidimensionalen optischen Messung an großen Proben⁷. Später wurden weitere Techniken publiziert, die der OPT bei mäßig großen Proben bis hin zu einigen wenigen Millimetern Dicke in zwei Eigenschaften klar überlegen sind. Sie besitzen eine höhere laterale Auflösung und eine höhere Messempfindlichkeit. All diese alternativen Fluoreszenzlichttechniken gehören zu den “Lichtblattmikroskopieverfahren” und sind unter dem Namen “light sheet based microscopy” (LSBM) zusammengefasst. Andere dreidimensionale Verfahren, wie z.B. konfokale Mikroskopie, unterliegen technischen Beschränkungen in der Probendicke oder wiederum der Empfindlichkeit.

Sowohl die Simulationen als auch die Messungen zeigen, dass es möglich ist, das Defizit der Auflösung der OPT mit einem Besselstrahl zu reduzieren. Dies ist allerdings mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Zum einen ist nicht hinreichend kontrollierbar, ob die Ringblende voll ausgeleuchtet wird. Zum anderen ist die transmittierende Fläche der Ringblende nach Formel (4.9) praktisch identisch mit der Fläche einer für die Fokusslänge äquivalenten Kreisblende. Die Aufnahmeintensität ist daher für beide Blendentypen praktisch identisch. Durch den zusätzlichen Kontrastverlust mit einer Ringblende wird das Defizit der Empfindlichkeit in der OPT weiter erhöht. Dies macht es praktisch unmöglich, mit einem Besselstrahl signifikante Auflösungsverbesserungen in der emissions-(fluoreszenz-)OPT zu erzielen.

Der einzige Vorteil der Besselstrahl-OPT gegenüber den Lichtblatttechniken läge in den erreichbaren Probengrößen [Sha02] und der Aufnahme von Transmissionstomogrammen. Artefakte, die hierbei durch Brechung hinzukommen, können allerdings den effizienten Einsatz der Ringblende für Transmissionbilder verhindern (vgl. Abschnitt 4.3.2). Es wäre nötig, eine Fokusverlängerung zu erzielen, die nicht mit einem entsprechend hohen Kontrastverlust verknüpft ist. Dies ist aus Prinzip schwierig bis hin zu unmöglich, da wie in Abschnitt 4.3 bereits festgestellt wurde, die laterale Auflösung über die CTF mit der axialen Auflösung verknüpft ist. Alternativ kann die in 3.5.3 vorgestellte “Stufenlinse” genutzt werden. Hierdurch wird zwar keine signifikante Kontrasterhöhung erzielt, allerdings ermöglicht sie das Sammeln von einer größeren Menge an Licht, was dem Kontrastverlust entgegenwirkt. Auch nichtlineare Techniken kommen auf Grund der Parallelität und Linearität der Detektion nicht in Frage.

Die bei Streulichtaufnahmen generierten Streifen (vgl. Abbildung 4.4b) verhindern einen effektiven Einsatz der Ringblende zur Auflösungsverbesserung. Dennoch ist zu erwarten, dass der beobachteten Effekt genutzt werden kann, um mit einer modifizierten Ringblende die Streurichtung im aufgenommenen Bild zu kodieren.

⁷ein Millimeter bis mehrere Zentimeter

5. Rekonstruktionsalgorithmen in der optischen Tomographie

Computertomographische Verfahren, die auf der Radontransformation basieren, benötigen stets eine mathematische Methode zur Rekonstruktion der gemessenen, dreidimensionalen Struktur. Die Rekonstruktion wird hier als Rückprojektion bezeichnet. Mit ihr kann aus den Projektionsaufnahmen eine dreidimensionaler Datensatz gewonnen werden. Die Daten können als Stapel von Schnittbildern angesehen werden, woraus sich auch der Name der Tomographie (altgriechisch *tomos*, „Schnitt“ und *graphein*, „zeichnen“ [Buz08]) ableitet.

Inhalt

5.1. Datensätze zur Beurteilung der Algorithmen	74
5.2. Inverse Radontransformation	74
5.2.1. Die Rückprojektion	74
5.2.2. Gefilterte Rückprojektion	74
5.2.3. Numerische Umsetzung	76
5.3. Fourierschnittrekonstruktion (FSR)	77
5.3.1. Fourierschnitttheorem (FST)	77
5.3.2. Interpolationsmethoden	78
5.4. Iterative Algorithmen	78
5.5. Sinogramauswertung	80
5.5.1. Vorfilterung und Sortierung	82
5.5.2. Phasen und Amplitudenfehler des Sinogramms	83
5.5.3. Richtung der minimalen Projektionsintensität	85
5.6. Ausführungsdauer	86
5.7. Diskussion	87

5.1. Datensätze zur Beurteilung der Algorithmen

Für dieses Kapitel wurden zwei Datensätze herangezogen. Zum einen Fluoreszenzaufnahmen eines Heuschreckengehirns im L1-Stadium. Mit einer Antikörperfärbung gegen Serotonin wurden hohe Serotoninkonzentrationen mit dem Farbstoff Cy3 angefärbt. Der Datensatz besitzt Projektionen mit einer Auflösung von 500 mal 500 Bildpunkten und eine Gesamtanzahl von 800 Projektionen, die auf eine 360° Rotation verteilt sind. Zum anderen ein in einer Masterarbeit [Lor11a] computergeneriertes Shepp-Logan Phantom [Kak99] (vgl. Abbildung 5.3a) mit einer Projektionsauflösung von 512 mal 512 Bildpunkten und einer Gesamtanzahl von 720 Projektionen, verteilt auf eine 360° Drehung.

5.2. Inverse Radontransformation

Johann Radon veröffentlichte mit der Radontransformation gleichzeitig die zugehörige inverse Radontransformation aus Gleichung (4.3) [Rad17]. Die Umsetzung dieser Invertierung kann mit der Rückprojektion oder auch der gefilterten Rückprojektion durchgeführt werden, was in den Abschnitten (5.3) und (5.4) genutzt wird. Daher werden diese beiden Operationen hier ausführlich beschrieben.

5.2.1. Die Rückprojektion

Unter der Rückprojektion versteht man eine mathematische oder auch numerische Methode zur Umkehrung der Radontransformation. In Anlehnung an Gleichung (4.2) wird hierbei $\tilde{f}(x, y, q = 0)$ ausgewertet:

$$\tilde{f}(x, y) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi R(x \cos\varphi + y \sin\varphi, \varphi) \quad (5.1)$$

Anschaulich kann dies durch das Verlängern eines projizierten Messpunktes entlang einer Linie über die gesamte Ebene dargestellt werden (siehe Abbildung (5.1)). Die Überlagerung aller Messpunkte entlang ihrer zugehörigen Linien liefert, nach Normierung, ein dem Messobjekt ähnliches aber stark verschwommenes Bild. Anwendung findet diese einfache Rückprojektion in iterativen Algorithmen, deren Funktionsweise in (5.4) dargelegt wird.

5.2.2. Gefilterte Rückprojektion

Ausgehend von der inversen Radontransformation aus Gleichung (4.3) [Rad17] kann diese in die Rückprojektion aus Abschnitt (5.2.1) und eine weitere, als Filterung bezeichnete lineare Operation zerlegt werden. Durch Nutzung der Kettenregel $\partial_q \tilde{f}(x, y, -q) = -\partial_q \tilde{f}(x, y, q)$ (siehe Anhang A) kann Gleichung (4.3) mit $p = x \cos\varphi + y \sin\varphi$ in eine Korrelation¹ [Ohm07] überführt werden.

¹Korrelationsintegral: $s(\tau) \star g(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} s^*(t)g(t + \tau)dt$

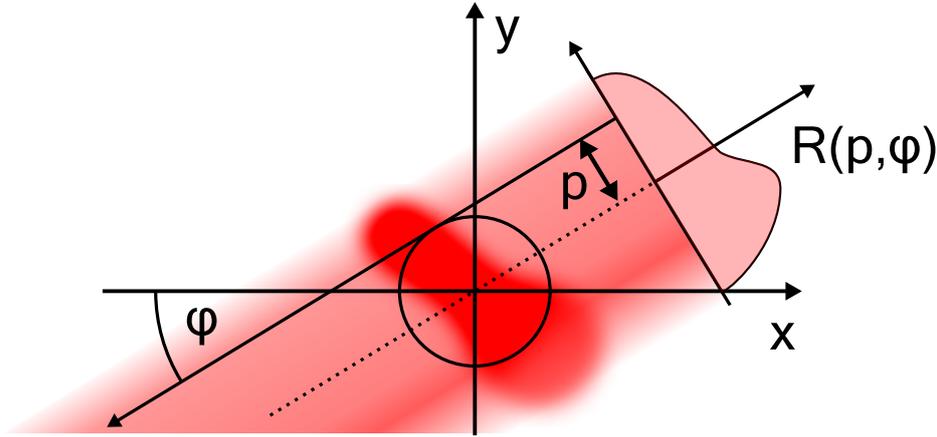


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung der Rückprojektion. $R(p, \varphi)$ wird entlang einer Geraden, die den Winkel φ mit der x-Achse einschließt auf die xy-Ebene projiziert.

$$f(x, y) = -\frac{1}{\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) = -\frac{1}{2\pi} \left(\int_{-\infty}^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) \quad (5.2)$$

$$= -\frac{1}{2\pi} \left(\int_{-\infty}^\infty dq \frac{\partial_q \left(\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi R(x \cos \varphi + y \sin \varphi + q, \varphi) \right)}{q} \right) \quad (5.3)$$

$$= -\frac{1}{(2\pi)^2} \left(\int_0^{2\pi} d\varphi \int_{-\infty}^\infty dq \frac{\partial_q (R(p + q, \varphi))}{q} \right) \quad (5.4)$$

$$= -\frac{1}{(2\pi)^2} \left(\int_0^{2\pi} d\varphi \int_{-\infty}^\infty dq \frac{\partial_p (R(p + q, \varphi))}{q} \right) \quad (5.5)$$

$$= -\frac{1}{(2\pi)^2} \left(\int_0^{2\pi} d\varphi \left(\frac{1}{p} \right)^* \star \partial_p (R(p, \varphi)) \right) \quad (5.6)$$

Diese Korrelation kann nun in eine Faltung² umgeformt werden[Ohm07]:

$$f(x, y) = -\frac{1}{(2\pi)^2} \left(\int_0^{2\pi} d\varphi \left(-\frac{1}{p} \right) \otimes \partial_p (R(p, \varphi)) \right) \quad (5.7)$$

Unter Nutzung des Faltungstheorems mit der Fouriertransformation der Variablen p zu deren Frequenz ν_p kann dieser Ausdruck in die sogenannte gefilterte Rückprojektion (engl. filtered back projection (FBP)) überführt werden:

$$f(x, y) = -\frac{1}{(2\pi)^2} \int_0^{2\pi} d\varphi FT_p^{-1} \left(FT_p \left(-\frac{1}{p} \right) FT_p (\partial_p R(p, \varphi)) \right) \quad (5.8)$$

²Faltungsintegral: $s(\tau) \otimes g(\tau) = \int_{-\infty}^\infty s(t)g(\tau - t)dt$

Sowohl die Ableitung von $R(p, \varphi)$ als auch $-\frac{1}{p}$ können durch die Fouriertransformation leicht ausgewertet werden³ [Ohm07]:

$$f(x, y) = -\frac{1}{(2\pi)^2} \int_0^{2\pi} d\varphi \text{FT}_p^{-1}(-i2\pi\nu_p \text{FT}_p(R(p, \varphi))(-i\pi \text{sign}(\nu_p)) \quad (5.9)$$

$$= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \text{FT}_p^{-1}(\pi|\nu_p| \text{FT}_p(R(p, \varphi))) \quad (5.10)$$

$$= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \tilde{R}(x \cos \varphi + y \sin \varphi, \varphi) \quad (5.11)$$

Hierbei handelt es sich um die Rückprojektion von $\tilde{R}(p, \varphi)$, die als gefilterte Version von $R(p, \varphi)$ bezeichnet wird.

5.2.3. Numerische Umsetzung

Eine direkte Implementierung der gefilterten Rückprojektion kann bereits mit diesem Wissen numerisch umgesetzt werden. Hierzu werden die als “parallel beam” vorliegenden Daten zunächst mit einer FFT fouriertransformiert.

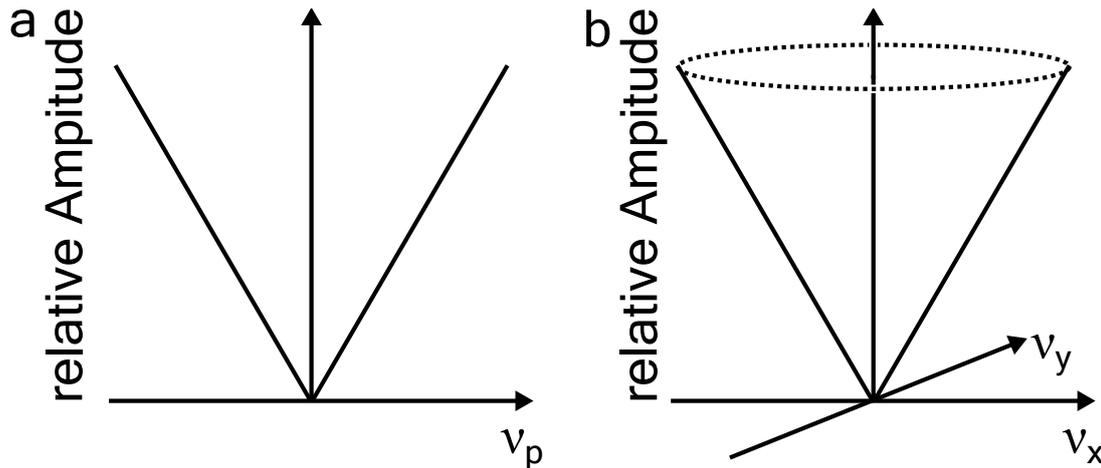


Abbildung 5.2.: Unnormierte Darstellung der Filterfunktionen für die gefilterte Rückprojektion. (a) Rampenfilter für die vorangestellte Filterung des Sinogramms. (b) Radialer Rampenfilter für die Filterung der rekonstruierten Ebene nach der Rückprojektion.

Um eine optimale Umsetzung zu gewährleisten, ist eine “Reell-zu-Komplex”-Transformation zu wählen. Diese nutzt die Symmetrieeigenschaften des Spektrums von reellen Werten aus, was den Rechen- und Speicheraufwand halbiert. Die Transformation muss für jede Zeile einzeln bzw. eindimensional senkrecht zur Rotationsachse durchgeführt werden. Im Frequenzbereich wird der Rampenfilter $\pi|\nu_p|$ (vgl. Gleichung (5.10) und Abbildung 5.2a) angewendet und danach die Rücktransformation

³An dieser Stelle wurden für die Fouriertransformation $FT(g(x)) = \int_{-\infty}^{\infty} g(x)e^{-i2\pi xt} dx$ und $FT^{-1}(G(t)) = \int_{-\infty}^{\infty} G(t)e^{i2\pi xt} dx$ nach Quelle [Ohm07] für die Auswertung gewählt.

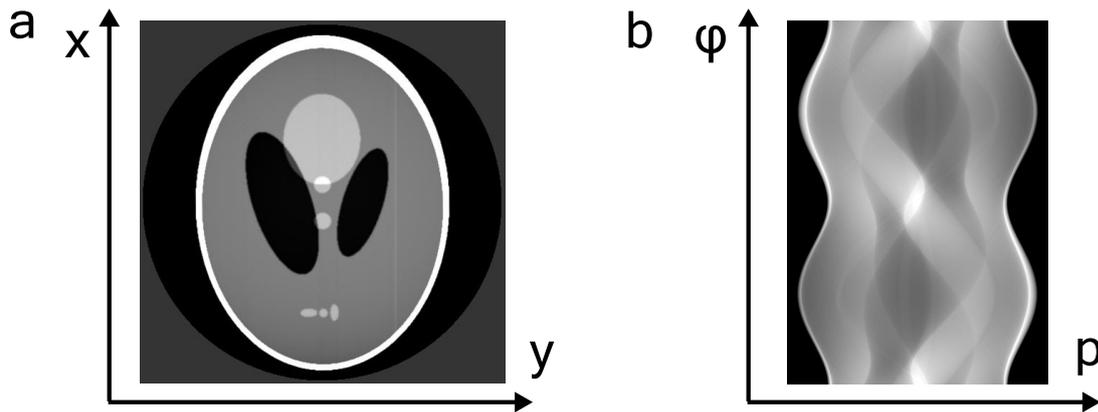


Abbildung 5.3.: Computergeneriertes Shepp-Logan-Phantom. (a) Rekonstruierte Ebene (b) Sinogrammdarstellung der Radontransformierten.

durchgeführt. Diese so gefilterten Daten werden dann auf die zugehörige Ebene projiziert. Für die Projektion kann z.B. eine linear interpolierte Linie, die mit dem gefilterten Wert gewichtet wurde, auf die Ebene addiert werden.

Alternativ könne auch die ungefilterten Sinogrammdaten zunächst zurückprojiziert werden und daraufhin mit einem zweidimensionalen, radialen Rampenfilter gefiltert (Abbildung 5.2b). Abbildung 5.3 zeigt eine rekonstruierte Ebene und das zugehörige Sinogramm, das die Radontransformierte darstellt.

5.3. Fourierschnittrekonstruktion (FSR)

Da die gefilterte Rückprojektion am Effizientesten mit einer FFT implementiert werden kann, ist es naheliegend, zu überprüfen, ob auch Operationen der Rückprojektion im Fourierraum umgesetzt werden können. Es stellt sich heraus, dass mit dem “Fourierschnitttheorem” (FST) (engl. “fourier slice theorem”) eine numerisch Umsetzung möglich ist [Buz08].

5.3.1. Fourierschnitttheorem (FST)

Um das FST zu verstehen, ist es am Einfachsten, die Impulsantwort einer Fouriertransformation zu kennen. Hierbei wird zunächst von einem analytischen System ausgegangen. Ein Deltapuls wird durch Fouriertransformation in eine konstante Funktion konvertiert. Wird also eine Linie, die entlang ihrer Achse ein Spektrum aufweist, fouriertransformiert, wird die eindimensionale Fouriertransformierte des auf der Linie dargestellten Spektrums senkrecht zu der Linie unendlich breit. Ist dieses Spektrum seinerseits die inverse Fouriertransformierte einer gemessenen Zeile, ergibt dies die äquivalente Operation zu der Projektion einer Zeile auf eine Ebene, wie sie oben beschrieben wurde (vgl. Abbildung (5.4)). Die Addition weiterer Winkel ist erlaubt, da es sich bei der Fouriertransformation um eine lineare Operation handelt. Bei einem zu niedrig abgetasteten Sinogramm, was der Aufnahme von zu

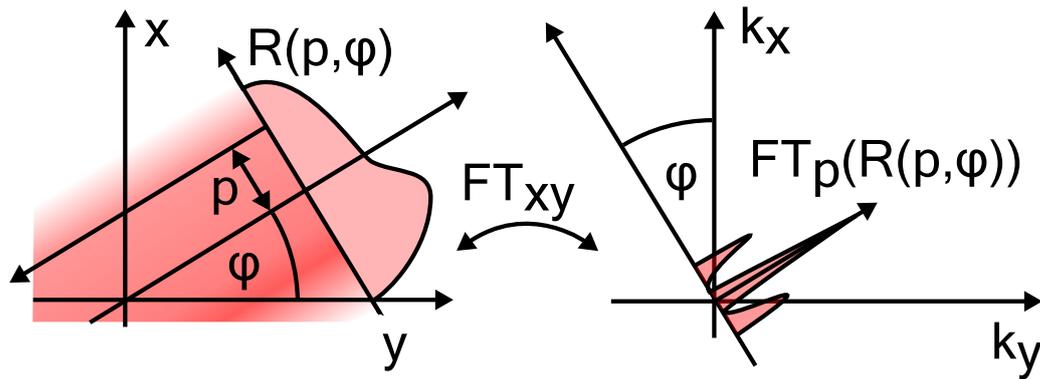


Abbildung 5.4.: Repräsentation einer einzelnen Rückprojektion in der Fouriertransformierten Ebene. Die bereits in Abbildung 5.1 dargestellte Rückprojektion wird bei der Fouriertransformation der xy -Ebene in eine Linie auf der $k_x k_y$ -Ebene überführt, deren Funktionswerte der in p Fouriertransformierten von $R(p, \varphi)$ entspricht.

wenigen Projektionen entspricht, können die Zeilen deutlich als ein großer Stern in der Fouriertransformierten der Ebene identifiziert werden (Abbildung 5.5a).

5.3.2. Interpolationsmethoden

Als numerische Methode besteht hier, genau wie bei der Simulation von Lichtfeldern, die Notwendigkeit der Interpolation (vgl. Abschnitt 3.4). Die Nutzung der “nearest neighbour” Interpolation erlaubt so die schnellste Umsetzung einer Rekonstruktion (siehe Abschnitt 5.6). Diese Methode wurde von dem Autor in der Programmierumgebung CUDA für Nvidia GPUs umgesetzt. Abbildungen 5.5b und 5.5d zeigt das Ergebnis der Rekonstruktion mit dieser Implementierung. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine CPU-basierte Version der Fourierschnittrekonstruktion (FSR) implementiert. Hierfür wurde zum einen die Zielebene in ihren Abmaßen für die Berechnung verdoppelt und danach wieder ausgeschnitten. Zum anderen wurde eine gefensterte und skalierte sinc-Interpolation verwendet. Beim Vergleich der beiden Implementierungen wird deutlich, dass die Nutzung einer geeigneten Interpolationsmethode zu einer drastischen Unterdrückung von aliasing-Effekten (vgl. Abbildungen 5.5b und 5.5c) gegenüber der Nächsten-Nachbar-Interpolation führt. Die Schwere der so hervorgerufenen Artefakte ist allerdings auch von den Messdaten selbst abhängig (vgl. Abbildung 5.5d und 5.5e).

5.4. Iterative Algorithmen

Um die beiden anderen Techniken in diesem Kapitel mit einem der weit verbreiteten iterativen Rekonstruktionsansätze zu vergleichen, wurde in der bereits in Abschnitt 5.5 erwähnten Masterarbeit [Lor11a] ein SIRT-Algorithmus implementiert. Ein Itera-

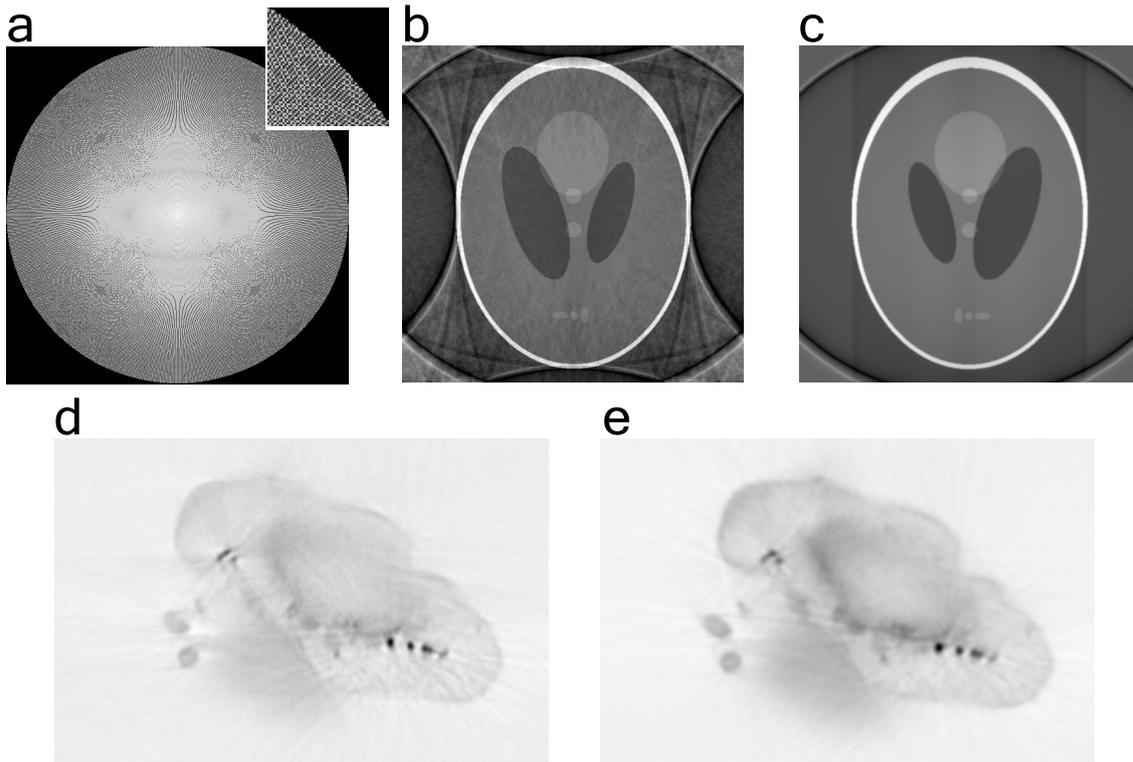


Abbildung 5.5.: FSR mit der nächsten-Nachbar- und der skalierten-sinc-Interpolation. (a) Logarithmisch dargestellte Fouriertransformierte der rekonstruierten Ebene aus (b). Rechts oben ist ein Teilausschnitt vergrößert dargestellt, um das sternförmige Muster der einzelnen Fourier Schnitte hervorzuheben. (b) Rekonstruktion des Shepp-Logan Phantoms mit der nächsten-Nachbar-Methode. (c) Wie (b) allerdings mit der skalierten-sinc-Interpolation. (d) Rekonstruktion einer Ebene des Heuschreckengehirns mit der nächsten-Nachbar-Methode. (e) Wie (d) allerdings mit der skalierten-sinc-Interpolation.

tionsschritt des Algorithmus kann mit der Radontransformation RT aus Gleichung (4.1) beschrieben werden als [Kak99]:

$$f_{i+1}(x, y) = f_i(x, y) + \xi \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi (RT(f_i(x, y))(p, \varphi) - R(p, \varphi)) \quad (5.12)$$

Mit $p = x \cos \varphi + y \sin \varphi$. Es kann mit einer leeren Ebene $f_0(x, y)$ begonnen werden, die nach Gleichung (5.12) zunächst radontransformiert wird um daraufhin die Differenz zu der Messung zu bilden. Die Differenz wird nun wieder rückprojiziert und zu der aktuellen (ersten) Ebene mit dem Faktor $\xi = 2^{-4}$ skaliert und addiert. Die so erhaltene Ebene ersetzt die vorherige (erste) Ebene, und der nächste Iterationsschritt kann durchgeführt werden, falls die Abbruchbedingung (hier $i = 100$) noch nicht erfüllt wurde.

Der Vergleich des SIRT-Algorithmus mit der gefilterten Rückprojektion zeigt, dass

⁴Der Faktor 2 ist hier empirisch gewählt worden.

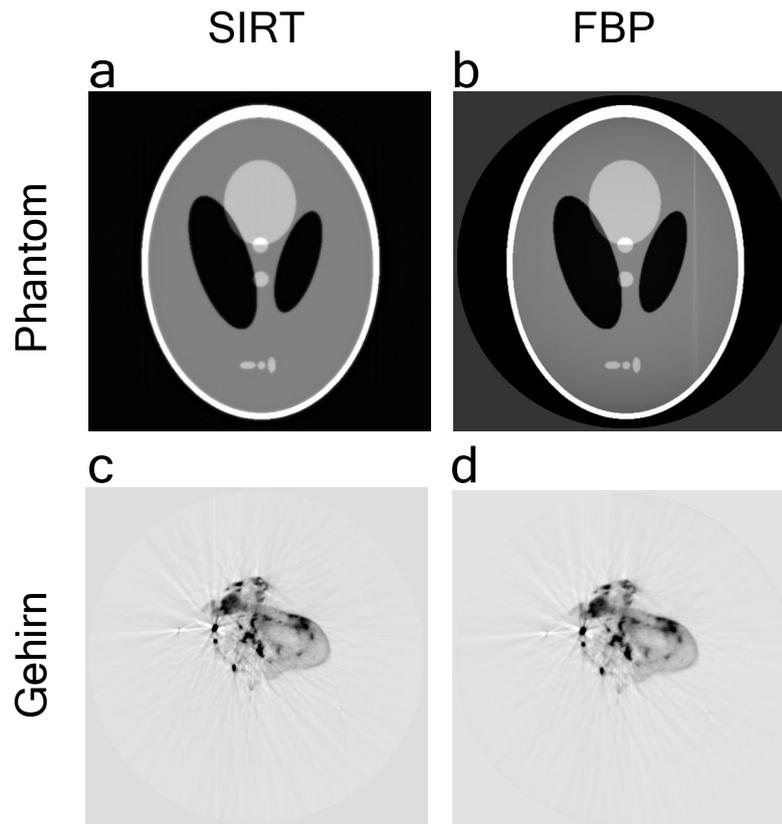


Abbildung 5.6.: SIRT Rekonstruktion und FBP Rekonstruktion. (a) Shepp-Logan Phantom mit SIRT Algorithmus rekonstruiert. (b) Shepp-Logan Phantom mit FBP Algorithmus rekonstruiert (c) Heuschreckengehirn mit SIRT Algorithmus rekonstruiert. (d) Heuschreckengehirn mit FBP Algorithmus rekonstruiert.

sich kein sichtbarer Vorteil sowohl für die gemessenen als auch für die Phantomdaten ergibt. Die Vorteile, die in anderen Veröffentlichungen [And84, Buz08] genannt wurden (hauptsächlich das Unterdrücken von Rauschen), konnten an den vorhandenen SLOT-Messdaten nicht nachvollzogen werden. Nichtsdestotrotz ist der Algorithmus prinzipiell geeignet, die aufgenommenen Daten zu rekonstruieren.

5.5. Sinogrammauswertung

Die FBP kann lediglich in die FSR überführt werden, da es sich um eine lineare Operation handelt. Die eigentliche Messung zur Generierung der Radontransformierten ist keine exakte Radontransformation. Um so mehr Fehler sich in die Grunddaten einschleichen, desto stärkere Artefakte bilden sich in der Rekonstruktion. Streifenartefakte z.B. treten in unterschiedlichem Maße nahezu immer auf (Abschnitt 5.5.1).

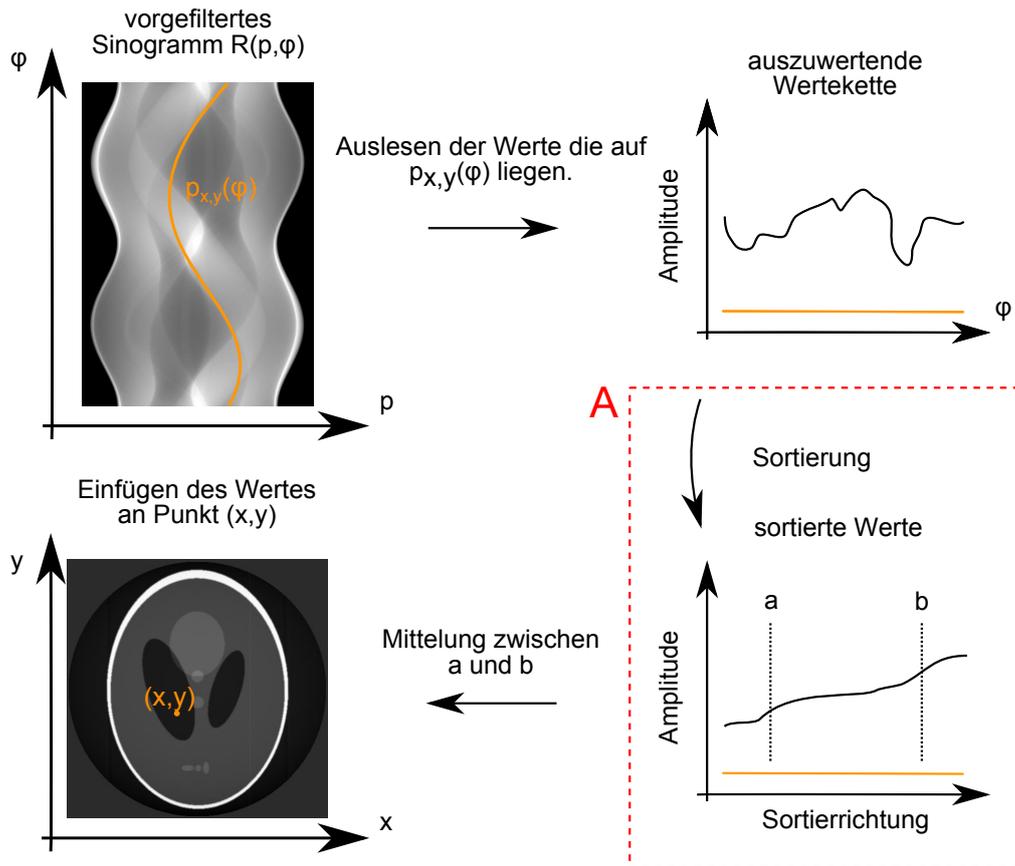


Abbildung 5.7.: Sinogrammaauswertung mit der Operation A am Beispiel der Sortierauswertung. Aus dem Sinogramm wird entlang der Funktion $p_{x,y}(\varphi) = x \cos \varphi + y \sin \varphi$ (vgl. Abschnitt 4.1.1) eine Wertfolge entnommen. Diese Wertekette wird der Größe nach sortiert um daraufhin zwischen zwei empirisch festgelegten Grenzen a und b den Mittelwert zu bilden und an der Position (x,y) in der Zielebene einzutragen.

Ein Ansatz um dem entgegenzuwirken, ist eine der inversen Radontransformation ähnliche Transformation durchzuführen, die nicht ausschließlich auf linearen Operationen basiert. Dies erlaubt es zudem neben der Intensitätsverteilung die Rekonstruktionsqualität und richtungsabhängige Probeneigenschaften abzuleiten. Für die Sinogrammaauswertung wird Gleichung (5.1) abgewandelt und das Integral durch eine Auswertungsoperation $A(R(p, \varphi))$ ersetzt:

$$\check{f}(x, y) = A(R(x \cos \varphi + y \sin \varphi, \varphi)) \quad (5.13)$$

$\check{f}(x, y)$ stellt die mit der Auswertungsoperation rekonstruierte Ebene dar.

Eine Sinogrammauswertung besteht im Allgemeinen aus drei Schritten (Abbildung 5.7). Zunächst wird das Sinogramm einer Vorfilterung unterzogen. Diese kann iterativ (Abschnitt 5.4) aber auch wie bei der gefilterten Rückprojektion mit einem

Rampenfilter im Frequenzraum (Abschnitt 5.2.2) geschehen. Daraufhin werden alle Werte aus den Projektionen, die zu einem Punkt beitragen, in neue eindimensionale Werteketten überführt. Hierbei wird aus dem Sinogramm für jeden Position (x, y) in der Zielebene entlang der Funktion $p_{x,y}(\varphi) = x \cos \varphi + y \sin \varphi$ (vgl. Abschnitt 4.1.1) eine Wertekette entnommen. Diese kann im letzten Schritt mit einem beliebigen eindimensionalen Operation A , die am Ende genau einen Wert zurückgibt, ausgewertet werden (Abbildung 5.7). Das Ergebnis wird in den zugehörigen Voxeln abgelegt. Für die normale Rückprojektion ist A eine Mittelwertbildung. Durch die Verallgemeinerung besteht allerdings auch die Möglichkeit, den Median die Standardabweichung oder spezifizierte Frequenzen zurückzugeben. Alternativ kann die Wertekette vor der Zusammenfassung zu einem Wert auch sortiert oder nicht linear (z.B. bilateral) gefiltert werden.

Um die benötigte Rechenzeit bei einer derart aufwändigen Rechenoperation zu minimieren, wurde der grundlegende Algorithmus im Rahmen einer Masterarbeit [Lor11a] auf der CUDA implementiert. Die folgenden Untersuchungen wurden mit dieser Implementierung durchgeführt.

5.5.1. Vorfilterung und Sortierung

Ein bei optischen Projektionsaufnahmen häufig auftretendes Artefakt äußert sich in Streifen, die das Bild durchziehen. Im Gegensatz zur Röntgentomographie, wo die Hauptursache in hohen Absorptionen und starkem Rauschen liegt, gibt es mehrere Ursachen für Streifenartefakte in der optischen Tomographie. Neben den in der Literatur genannten Effekten der starken Absorption und Fehlkalibrierung des Detektors [Kac98, Wal05], konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Probenart und Präparation direkten Einfluss auf die Artefaktausprägung besitzt. Eine häufig auftretende Ursache sind Reflexionen in Streulichtaufnahmen. Diese wurden bei der *Locusta migratoria* durch Teilreflexion und Totalreflexion beim Übergängen von der Flüssigkeit zu Gaseinschlüssen hervorgerufen (vgl. Abschnitt 6.4.3). Bei den *Godzilliognomus* traten Teilreflexionen bei flachen Einfallswinkeln zu deren Panzer auf, welcher einen anderen Brechungsindex als das innere Weichgewebe besitzt.

Da bei bisher noch nicht untersuchten Proben andere optische Ursachen für Streifenartefakte auftreten können, ist eine die Ursachen einbeziehende Anpassung der Rekonstruktionsalgorithmen aufwendig und komplex. Es ist von Interesse einen Rekonstruktionsalgorithmus zu entwickeln, der durch Abstrahierung des Problems möglichst viele Ursachen einschließt, ohne diese genau zu kennen. Die bekannten Ansätze aus der Computertomographie sind hierfür nicht uneingeschränkt geeignet. Die Maskierung von Metallobjekten [Kac98] ist zu speziell um auf einen allgemeinen Ansatz erweitert zu werden. Adaptive Filter beziehen sich ausschließlich auf das Sinogramm [Kac98], was Effekte die sich in unterschiedlichen Bereichen der rekonstruierten Ebene unterschiedlich stark entfalten nicht berücksichtigen kann.

Als Arbeitshypothese wird davon ausgegangen, dass einzelne Streifen stets durch wenige Projektionen hervorgerufen werden. Ist es unter diesen Voraussetzungen

möglich eine allgemeine Identifikation der Streifenbildenden Daten durchzuführen und diese daraufhin auszuschließen, ist auch eine Verbesserung der Rekonstruierten Daten zu erwarten. Hierfür wird eine Sortierauswertung genutzt. Die Sortierauswertung (rot gestrichelter Kasten in Abbildung 5.7) kann in zwei Schritte unterteilt werden. Der erste Schritt ist die Sortierung aller zu einer einem Voxel zugehörigen Werte nach ihrer Größe. Im zweiten Schritt wird ein zuvor festgelegter Bereich $[a, b]$ der so entstandenen Wertekette gemittelt und dem Voxel zugeordnet.

Die Vorfilterung der Daten ist ein weiterer entscheidender Faktor für die Effektivität des Algorithmus. Da die Auswertungsfunktion A nur die Strahlen, die zu einem Punkt beitragen, untersucht und nicht deren Nachbarstrahlen, ist es notwendig, die Beziehung der Strahlen zueinander zuvor zu berücksichtigen. Dies kann durch das Vorfiltern der Daten erreicht werden.

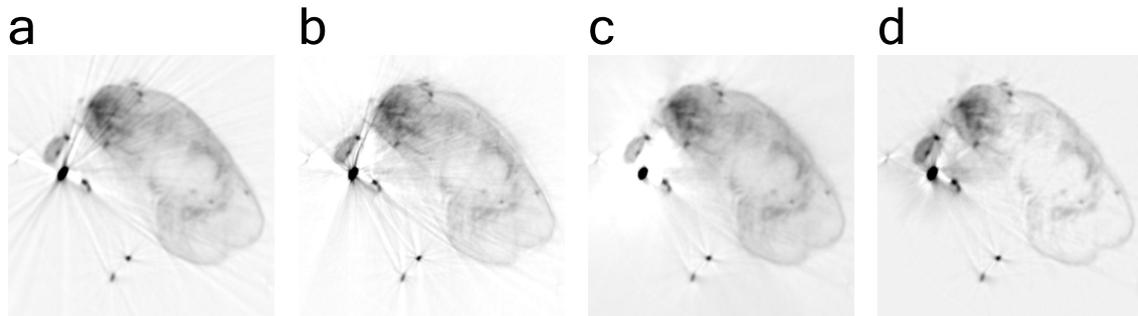


Abbildung 5.8.: Eine Rekonstruierte Ebene des Heuschreckengehirns. (a) Mit gefilterter Rückprojektion rekonstruiert. (b) Mit sortierender Sinogrammauswertung und nachgestellter Rampenfilterung rekonstruiert. (c) Mit sortierender Sinogrammauswertung und vorgestellter Rampenfilterung rekonstruiert. (d) Wie (c) mit nachträglicher lokaler Hintergrundentfernung (ImageJ [MA04, Bur07]).

Der Unterschied soll nun anhand der Sortierauswertung, untersucht werden. Hierbei wird zusätzlich eine für die gefilterte Rückprojektion äquivalente nachgestellte Filterung angewendet.

Abbildung 5.8 zeigt die Resultate. Die gefilterte Rückprojektion der Ebene enthält Streifenartefakte (Abbildung 5.8a), die durch die Anwendung des Sortieralgorithmus mit nachgestelltem Filterungsschritt (Abbildung 5.8b) lediglich leicht reduziert werden. Wird die Filterung vorangestellt (Abbildung 5.8c), können die Streifenartefakte effektiv unterdrückt werden. Allerdings entstehen lokale Helligkeitsschwankungen, die die Bildinformationen in unmittelbarer Nähe von hohen Werten kaschieren. Hier ist es möglich einen Algorithmus zur lokalen Hintergrundminimierung (ImageJ [MA04, Bur07]) anzuwenden, um dieses Artefakt nachträglich zu unterdrücken (Abbildung 5.8d).

5.5.2. Phasen und Amplitudenfehler des Sinogramms

Streifenartefakte werden durch den Sortieralgorithmus aus Abschnitt 5.5.1 unterdrückt. Es ist allerdings nicht notwendig, alle Voxel mit dem selben Algorithmus zu

rekonstruieren. Durch die Entwicklung eines Maßes für die Qualität der Rohdaten die zu einem Voxel beitragen, kann eine Maske erstellt werden, die z.B. zwischen zwei verschiedenen Algorithmen wählt. Als ein mögliches Maß soll nun der „Schwerpunkt des rekonstruierten Voxels“ bestimmt werden. Für eine ideale Radontransformierte gilt nach Gleichung (4.1) mit einer abgewandelten Rückprojektion:

$$\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi R(x \cos \varphi + y \sin \varphi, \varphi) \begin{pmatrix} \cos \varphi \\ \sin \varphi \end{pmatrix} = 0 \quad (5.14)$$

da durch die Symmetrieeigenschaften $R(p, \varphi) = R(-p, \varphi + \pi)$ das Integral in zwei identische aber vom Vorzeichen umgekehrte Integrale zerlegt werden kann. $\begin{pmatrix} \cos \varphi \\ \sin \varphi \end{pmatrix}$ repräsentiert hierbei die Richtung, aus der $R(x \cos \varphi + y \sin \varphi, \varphi)$ aufgenommen wurde. Die Symmetrieeigenschaft von $R(p, \varphi)$ ist bei realen Messdaten praktisch nie erfüllt. Daher kann mit der Sinogrammauswertung die Abweichung in Form von Phase (Richtung) und Amplitude (Überschuss gegenüber dem Symmetrischen Fall) des resultierenden Vektors untersucht werden.

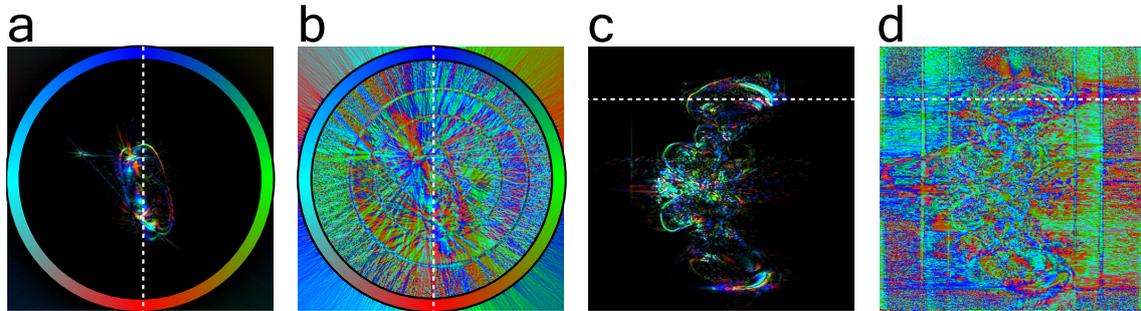


Abbildung 5.9.: Restvektor der nach Gleichung (5.14) rekonstruierten Daten des Heuschreckengehirns bei einer vorgefilterten Rückprojektion. Die Amplitude ist in der Helligkeit codiert, die Phase in der Farbe. Die weiß gestrichelten Linien zeigen die Position der senkrechten Schnitte an. (a) Rekonstruierte Ebene. Der Ring zeigt, welche Richtung welcher Restphase zuzuordnen ist. (b) Wie (a) allerdings ohne Amplitudeninformation. (c) Senkrechter Schnitt zu (a). (d) Senkrechter Schnitt zu (b).

Das resultierende Ergebnis für eine gefilterte Rückprojektion ist in Abbildung 5.9 als Falschfarbendarstellung gezeigt. Abbildung 5.9a zeigt, dass der absolute Restfehler für Positionen außerhalb des Objekts sehr klein wird. Dies äußert sich in Abbildung 5.9b auch durch das zunehmend chaotische Verhalten der Phase in diesen Bereichen. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei einem senkrechten Schnitt durch die rekonstruierten Ebenen (Abbildungen 5.9c und 5.9d). Die Fehleramplituden ähneln zwar der gefilterten Rückprojektion, jedoch ist keine eindeutige Korrelation vorhanden. Daher existieren Bereiche in der gefilterten Rückprojektion, die das Objekt beschreiben und Gleichung (5.14) nahezu erfüllen. Somit ist es möglich ein Qualitätsmerkmal für jeden einzelnen Voxel abzuleiten. Weiterhin ist auffällig, dass vertikale

Kanten in Abbildung 5.9a bevorzugt rot und blau, horizontale Kanten hingegen magenta und grün dargestellt werden. Dies deutet z.B. auf Überhöhungseffekte an Kanten oder auf ein nichtlineares Ansprechverhalten des Detektors hin [Wal05].

5.5.3. Richtung der minimalen Projektionsintensität

Soll in zukünftigen Anwendungen auch die Manipulation der Probe mittels Laserlicht durchgeführt werden, erlaubt die Sinogrammaauswertung die Bestimmung der optimalen Bestrahlungsrichtung. Als ein wichtiger Parameter soll hier die Richtung ausgewertet werden, die ohne Vorfilterung minimal zu dem Zielvoxel beiträgt. Hierfür kann es zwei Ursachen geben. Die Erste ist, dass es sich um die Blickrichtung mit dem geringsten Hintergrundsignal handelt. Dies ist bei aufgeklärten und nicht bzw. schwach absorbierenden Proben der Fall. Somit gibt die bestimmte Richtung die Richtung mit der geringsten Menge an „Hindernissen“ an. Die Zweite ist, dass es sich um die Richtung mit der höchsten Signalabschwächung beispielsweise durch Absorption oder Reflexion und damit um eine Artefaktquelle handelt. Dieser Effekt müsste bei entsprechenden Proben durch weitere bzw. alternative Auswertungsalgorithmen berücksichtigt werden.

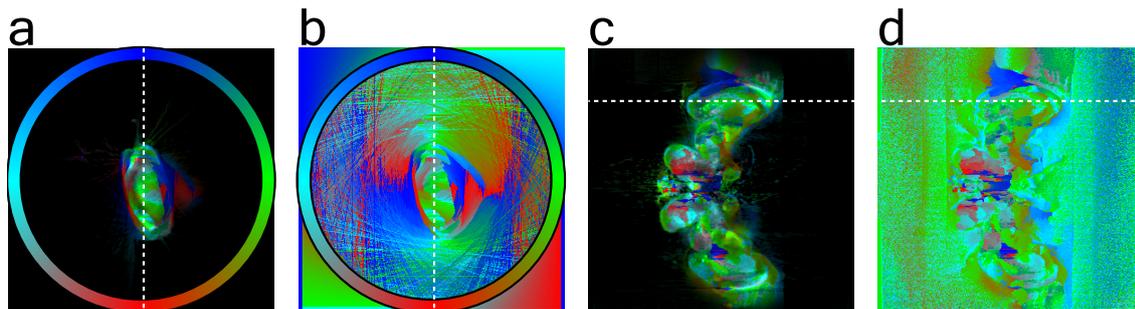


Abbildung 5.10.: Darstellung der Richtung minimaler Projektionsintensität der Rekonstruktion eines Heuschreckengehirns bei einer ungefilterten Rückprojektion. Die logarithmierte Intensität einer gefilterten Rückprojektion ist in der Helligkeit kodiert, die Phase in der Farbe. Die weiß gestrichelten Linien zeigen die Position der senkrechten Schnitte an. (a) Rekonstruierte Ebene. Der Ring zeigt, welche Richtung welcher Phase zuzuordnen ist. (b) Wie (a) allerdings ohne Amplitudeninformation. (c) Senkrechter Schnitt zu (a). (d) Senkrechter Schnitt zu (b).

Abbildungen 5.10b und 5.10d zeigen die mit dieser Methode rekonstruierten Bilder. Um das Rauschen in den Bereichen außerhalb der Probe zu unterdrücken, wurde die logarithmierte und gefilterte Rückprojektion als Intensität verwendet (Abbildungen 5.10a und 5.10c). Hier wird sichtbar, dass sich die Richtungen minimalen Beitrags das Gehirn im Verhältnis zu Abschnitt 5.5.2 in scharf voneinander trennbare Einheiten unterteilen. Diese stellen zwar keine anatomischen Eigenschaften dar, allerdings scheinen die beiden oben genannten Ursachen für die minimalen Werte hier durch

größere Strukturen hervorgerufen zu werden. Diese Strukturen erstrecken sich auch über mehrere Ebenen (Abbildung 5.10c).

5.6. Ausführungsdauer

Um, abgesehen von dem Informationsgewinn der Rekonstruktion, weitere Kriterien für die Auswahl des passenden Rekonstruktionsalgorithmus heranzuziehen, ist die Rekonstruktionsgeschwindigkeit häufig ein wichtiger Faktor. Die vorgestellten Verfahren wurden auf einem speziell für die CUDA-Implementierung angepassten System getestet.

Implementierung	Laufzeit L1 Heuschreckengehirn (500x500x800) [ms]	Laufzeit Shepp-Logan Phantom (512x512x720) [ms]
Standardalgorithmen		
FSR CPU-Implementierung	836000	788000
FSR Nächster-Nachbar	219	172
FBP	688	668
SIRT	351342	352413
Sinogrammaauswertung		
Sortieren (optimiert)	42127	45034
Fehler (Phase/Amplitude)	83175/83163	121018/121000
minimale Intensität (Richtung)	72509	118366

Tabelle 5.1.: Laufzeiten der Rekonstruktionsalgorithmen in Kapitel (5).

Das System besitzt zwei NVIDIA GeForce 590GTX Grafikkarten mit insgesamt 4 Grafikprozessoren, zwei Vierkern-Intel-CPU's und 24 GB Arbeitsspeicher. Zur Evaluierung wurde das Programm für Linux (Kubuntu) kompiliert und lediglich die Laufzeit des Algorithmus bestimmt. Die Laufzeitmessungen wurden für beide in Abschnitt 5.1 genannten Datensätze durchgeführt und in Tabelle (5.1) zusammengefasst. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da die genauen Rechenzeiten von unzureichend genau reproduzierbaren Systemparametern abhängen. Daher sind die gemessenen Zeiten als Größenordnungen anzusehen. Auch unter diesen Voraussetzungen lassen sich Schlussfolgerungen ziehen. Die CUDA-Implementierung ist der CPU Implementierung stets überlegen. Die FSR mit der Nächsten-Nachbar-Interpolation stellt bei weitem das schnellste Verfahren dar. Eine direkte Implementierung der FBP benötigt auf Grund dessen Eignung für die CUDA ungefähr die dreifache Rechenzeit. Alle anderen Algorithmen benötigen bis hin zu 6 Minuten für eine vollständige Rekonstruktion. Dies ist immer noch schneller als die Aufnahme entsprechender Datensätze mit einem SLOT (siehe Kapitel (6)).

5.7. Diskussion

Die Rekonstruktion von computertomographischen Daten ist ein rechenaufwendiges Verfahren, das - wie hier gezeigt wurde - durch die aktuelle Computerentwicklung mittlerweile unterhalb von einer Sekunde durchgeführt werden kann (Abschnitt 5.6). Als schnellste Methode hat sich die Fourierschnittrekonstruktion herausgestellt, deren Qualität und endgültige Geschwindigkeit wiederum von der gewählten Interpolationsmethode abhängt (Abschnitt 5.3.2). Die Messdaten eines optischen oder auch eines Röntgentomographen stellen eine physikalisch erstellte Radontransformation dar. Diese Transformation weicht allerdings stets von der idealen Radontransformation ab, weshalb die inverse Radontransformation bzw. deren Umsetzung als FBP nicht zwangsläufig in der Lage ist, die gemessenen Daten korrekt in ein Tomogramm zu überführen. Der nächste Schritt sollte daher in der Optimierung der Rekonstruktionsalgorithmen durch Abwandlungen von der FBP liegen. Diese Abwandlungen können auf Grund der Rechenleistung heutiger Rechnerarchitekturen durchaus rechenaufwändiger ausfallen als die Rückprojektion ohnehin schon ist. Hier wurde als eine der leistungsfähigsten Architekturen für diese Problemstellung die CUDA ausgewählt.

Das iterative Rekonstruktionsverfahren SIRT zeigte keine Verbesserungen für die optisch tomographischen Daten (Abschnitt 5.4). Iterative Verfahren sollten allerdings nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Zum einen existieren mittlerweile eine Vielzahl an Algorithmen, die hier nicht untersucht werden konnten und zum anderen könnten die Eigenschaften zukünftiger Tomographen dazu führen, dass iterative Algorithmen dennoch Vorteile bieten.

Durch das häufige Auftreten von Rekonstruktionsartefakten wurde nach einer Lösung gesucht um Streifenartefakte zu unterdrücken. Hierfür wurde mit der Sinogrammauswertung ein gänzlich neuer „Rekonstruktionsansatz“ verfolgt (Abschnitt 5.5). Dieser erlaubt es unerwünschte Werte auszuschließen. Mit dem Ausschluss von Werten konnten erfolgreich Streifenartefakte unterdrückt werden (Unterabschnitt 5.5.1). In der Röntgentomographie wurden hierfür bereits adaptive Filterungen im Sinogramm oder Maskierungen im Sinogramm [Kac98] verwendet. Diese Ansätze sind allerdings lediglich eingeschränkt auf die optische Tomographie übertragbar, da dort zusätzliche Ursachen für Streifenartefakte existieren (Abschnitt 5.5.1).

Im Gegensatz zu der adaptiven Filterung und Maskierung ist die Sinogrammauswertung in der Lage die Filterung oder auch die Maskierung für jeden Voxel individuell durchzuführen. Zusätzlich können andere Informationen neben der Objektform aus den Messdaten gewonnen werden. Hier wurden beispielhaft ein Qualitätskriterium für die rekonstruierten Daten der gefilterten Rückprojektion (Unterabschnitt 5.5.2) und ein Maß für „direkte“ Blickwinkel auf einen Voxel (Unterabschnitt 5.5.3) demonstriert.

6. Scannende laseroptischer Tomographie (SLOTy)

Die in dieser Arbeit entwickelte “scanning laser optical tomography”, oder kurz SLOTy, ist in ihren Arbeitsprinzipien der OPT sehr ähnlich. Dennoch erreicht sie deutlich bessere Ergebnisse bei denselben Proben. Dies äußert sich in erster Linie durch ein deutlich erhöhte Empfindlichkeit, die Vermeidung von Ringartefakten und einer gleichmäßigen Ausleuchtung [Lor11c]. Zusätzlich sind prinzipiell alle Wechselwirkungseffekte der OPT auch für SLOTy zugänglich. Einige dieser Effekte werden im Detail in Abschnitt 6.4 dargelegt.

Inhalt

6.1. Der scannende laseroptische Tomograph (SLOT)	90
6.2. Vergleich von SLOTy mit OPT	91
6.2.1. Effizienzsteigerung	91
6.2.2. Geschwindigkeit	93
6.2.3. Objektgröße	94
6.3. Optisches Aufklaren	95
6.4. Kontrastmechanismen in der SLOTy und OPT	96
6.4.1. Absorption bzw. Extinktion	96
6.4.2. Brechung	97
6.4.3. Streuung	98
6.4.4. Fluoreszenz	99
6.4.5. Autofluoreszenz	100
6.5. Diskussion	101

6.1. Der scannende laseroptische Tomograph (SLOT)

Mit dem Vorwissen über die OPT aus Kapitel 4 kann SLOTy als eine Technik verstanden werden, bei der die Beleuchtung und die Detektion umgekehrt zur OPT durchgeführt werden. Der Lichtweg zur Detektion in der OPT wird mit einem Scanner zur einer laserscannenden Beleuchtung umfunktioniert. Der Lichtweg zur Beleuchtung in der OPT wird mit einem großflächigen Detektor zur Detektion umgerüstet.

Ein SLOT ist in seiner Grundform auf die simultane Detektion von Transmissions- und Absorptionstomogrammen ausgelegt. Der prinzipielle Aufbau eines SLOT ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

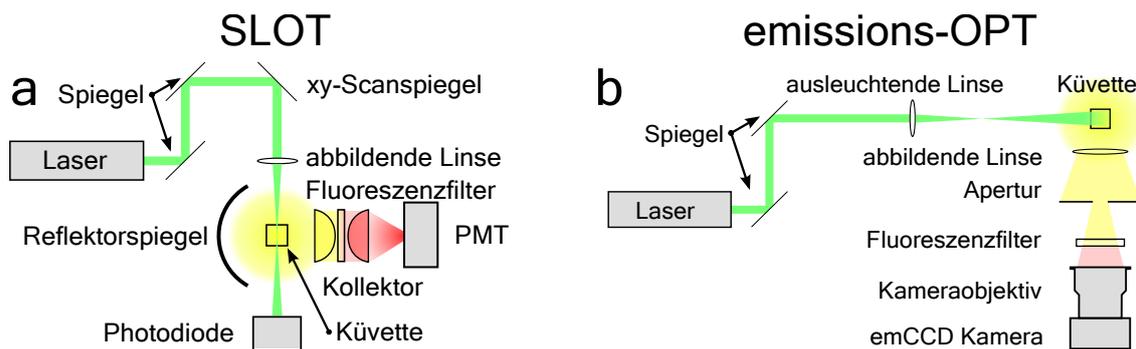


Abbildung 6.1.: Schematische Darstellung der Versuchssysteme [Lor11c]. (a) SLOT. PMT: „Photomultiplier Tube“ (b) Emissions-OPT mit Laserstrahl-anregung. emCCD: „electron multiplying Charge-Coupled Device“

Ein Laserstrahl wird über zwei Spiegel mit insgesamt vier Freiheitsgraden für Höhe und Winkel auf einen xy-Scanspiegel gelenkt. Typischerweise besteht dieser aus zwei einzelnen galvo-Scannern, wobei für die Trennbarkeit der Ebenen während der Rekonstruktion der vertikale (y -)Scanner in der hinteren Brennebene der abbildenden Linse¹ liegt und dort die Telezentrie entlang der Rotationsachse wahrt. Auf diese Weise kann der schwach fokussierte Laserstrahl senkrecht zu seiner Propagationsrichtung versetzt werden und das gesamte Volumen abrastern. Werden an jeder Rasterposition die Detektoren ausgelesen, entsteht ein zur OPT-Projektion äquivalentes Bild. Als Detektor für das transmittierte Licht kann eine Photodiode genutzt werden. Hierfür kann zusätzlich noch eine Sammeloptik vor der Photodiode² eingesetzt werden, ist aber nicht zwingend erforderlich. Die Intensität des Laserstrahls reicht aus, um das Signal deutlich aus dem Grundrauschen der Photodiode hervortreten zu lassen. Die große Anzahl an Photonen verhindert zudem, dass das Schrotrauschen des Lasers das Signal dominiert. Zur Detektion der Fluoreszenz bietet sich ein PMT³ (Photomultiplier Tube) an. Eine Kombination aus Reflektor und Kondensorlinse kollimiert das

¹Asphärischer Achromat (Edmund Optics: NT49-662) mit einer Brennweite von 30 mm. Für Abbildungen 6.4 und 6.8 wurde ein telezentrisches F-Theta-Objektiv (Sill Optics S4LFT0080/121) verwendet.

²PDA36A, Thorlabs

³Es handelt sich um einen PMT von Hamamatsu (R6357, HAMAMATSU Photonics). Für Abbildungen 6.4 und 6.8 wurde ein weiterer PMT verwendet (R3896, HAMAMATSU Photonics).

Licht, das senkrecht aus dem Probenvolumen austritt. Ein dichroitischer Fluoreszenzfilter wirft das gestreute Anregungslicht des Lasers zurück und transmittiert lediglich Fluoreszenzphotonen. Das Licht, welches auf Grund der Probengröße nicht mehr in einen Punkt fokussiert werden kann, wird nun über eine zweite Kondensorlinse auf die aktive Fläche eines PMT abgebildet. PMTs bieten sehr große aktive Flächen, wodurch eine exakte Abbildung unnötig ist.

Sowohl die Vorbereitung, Halterung und Bewegung der Probe, als auch die Auswertung der Daten erfolgt äquivalent zu denen eines optischen Projektionstomographen (siehe 4.2.2). Der in Abbildung 6.1b dargestellt emissions-OPT Aufbau unterscheidet sich lediglich in der Ausleuchtung von dem Aufbau aus Kapitel 4. Das Anregungslicht wird hier von demselben Laser zur Verfügung gestellt wie bei dem SLOT. Lediglich eine Linse mit 150 mm Brennweite und eine Blende (die nicht in Abbildung 6.1b nicht eingezeichnet wurde) weiten den Strahl zuvor auf die Probengröße auf. Der Fluoreszenzfilter ist ebenfalls identisch.

6.2. Vergleich von SLOTy mit OPT

Sowohl die OPT als auch SLOTy basieren auf der tomographischen Erfassung von Objekten mit Licht. Dennoch unterscheiden sich einige Eigenschaften stark voneinander. Zwar kann unter gewissen Umständen eine OPT-Aufnahme schneller als eine SLOT-Aufnahme durchgeführt werden. Die relevanten Vorteile von SLOTy gegenüber der OPT liegen jedoch in dessen erhöhter Effizienz, der kompletten Vermeidung von Ringartefakten und einer nahezu perfekten homogenen Ausleuchtung.

6.2.1. Effizienzsteigerung

Die für die Radontransformation zwingende Erhöhung der Tiefenschärfe für eine optische Projektion reduziert den Öffnungswinkel des Detektors und damit auch die Empfindlichkeit der OPT. Dieser Zusammenhang kann für isotrope Emittter durch den Anteil des Öffnungswinkels an der Vollkugel bestimmt werden (siehe Anhang B) [Lor11c]:

$$\text{Empfindlichkeit} = \frac{1}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA}}{n} \right)^2} \right] \approx \frac{(\text{NA}/n)^2}{4} \quad (6.1)$$

Dieser Ausdruck ist bis auf die Quanteneffizienz des Detektors identisch mit Gleichung (2.46) und in Abbildung 6.2b graphisch dargestellt.

Um die Empfindlichkeit weiter zu steigern ist es somit notwendig, den Detektionsöffnungswinkel zu vergrößern und dennoch die Tiefenschärfe zu erhalten. Da dies in einem optischen Kanal nicht erfüllbar ist, kann auf einen zweiten Kanal ausgewichen werden. Auch die OPT nutzt bereits zwei optische Kanäle: einen Beleuchtungs- und einen Bildgebungskanal. Der Beleuchtungskanal trägt bei einer idealen Homogenisierung allerdings nur zu der Intensität der Bildgewinnung bei. Wird stattdessen der Beleuchtungskanal mit einem Laserstrahl zur Auflösungs- und Tiefenschärferhaltung eingesetzt, kann der Detektionskanal durch eine zeitliche Aufspaltung

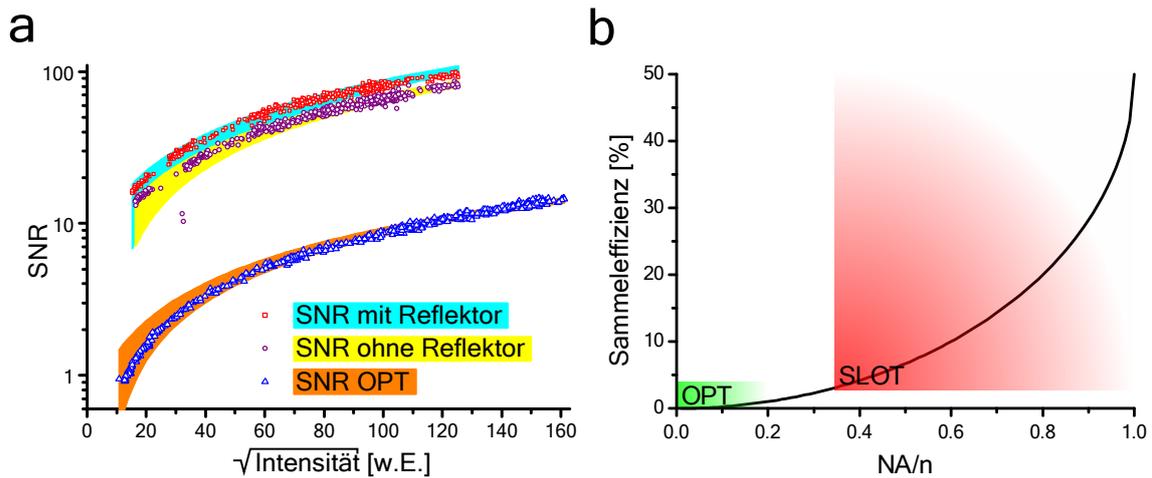


Abbildung 6.2.: Effizienzvergleich von SLOT mit der OPT [Lor11c]. (a) SNR Verhalten durch Ableitung aus den Rauschcharakteristika aus einer Serie von 200 Aufnahmen aus derselben Richtung. Untersucht wurden die Aufbauten aus Abbildung 6.1 und der SLOT ohne eingebauten Reflektorspiegel. Abweichende Beleuchtungs- und Aufnahmeparameter erforderten eine Anpassung der Intensitätsverteilung des OPT-Aufbaus. (b) Theoretische Sammeleffizienz (Anteil der den Detektor erreichenden Photonen an allen emittierten Photonen) in Abhängigkeit von der Detektions NA und dem Brechungsindex n im Medium. Die Arbeitsbereiche der OPT und von SLOTy sind durch die farbigen Hinterlegungen angedeutet.

der Information zum effizienten Sammeln der erzeugten Photonen genutzt werden. Die Rechtecke in Abbildung 6.2b deuten die Effizienzsteigerung bereits an. Der tatsächliche Effizienzgewinn ist von Probe und Aufbau abhängig. Der Vergleich der Effizienzen zwischen OPT und SLOTy wurden mit einem SLOT durchgeführt, dessen Kollimator aus zwei Linsen mit 25 mm Durchmesser und 25 mm Brennweite besteht. Die theoretisch effektive NA beträgt somit 0,46, die der Reflektorspiegel im Idealfall verdoppeln sollte.

Für den speziellen Fall, dass die Versuchsaufbauten aus Abbildung 6.1 bei einer Projektionstiefe von 1,25 mm ($NA=0,037$) und einer Bildaufnahmedauer von zwei Sekunden⁴ verglichen werden, ergeben sich die SNR Kurven in Abbildung 6.2a. Das SNR wurde hierbei über das Rauschverhalten einer Standbildserie ermittelt. Hierfür wurden jeweils 200 Projektionen aus derselben Richtung aufgenommen. Die Bilder wurde an 500 Stellen mit einem 5 Pixel breiten Bereich untersucht (ImageJ [MA04, Bur07] Makro siehe Anhang D). Zum einen wurde das Signal bzw. die Intensität aus dem Mittelwert der Werte aller Projektionen aus dem jeweiligen Bereich

⁴Dies bedeutet zwei Sekunden Integrationszeit für die emCCD-Kamera und durch den mechanischen Scanvorgang eine effektive Integrationszeit von 1,5 Sekunden für die SLOT-Aufnahmen. Die entsprechenden Zeitunterschiede und unterschiedliche Ausleuchtungsintensitäten spiegeln sich in Abbildung 6.2a in der Reskalierung des SNR-Signals der OPT wieder.

gebildet. Zum anderen wurden aufeinander folgende Bilder von einander abgezogen und die Varianz innerhalb der einzelnen Bereiche bestimmt. Die mittlere Varianz aller Messungen zu einem Bereich wurde als Rauschen gewertet. Das Verhältnis beider Messungen wird als SNR interpretiert [Lor11c].

Auf Grund der nicht exakt kontrollierbaren Beleuchtungsparameter wurden die bestimmten Intensitätswerte daraufhin relativ zueinander reskaliert. Des weiteren wurde wegen der stark unterschiedlichen Auslesecharakteristika der Detektoren das Signal des CCD-Chips zuvor um 488 Messeinheiten vermindert [Lor11c].

Die Messungen in Abbildung 6.2a zeigen deutlich eine Effizienzsteigerung des SLOT gegenüber der OPT. Aus Gleichung 2.17 kann darauf geschlossen werden, dass der SLOT ohne Reflektor 60 ± 15 mal mehr Licht detektiert als der OPT Aufbau. Mit Reflektor wird lediglich die Hälfte der theoretischen Steigerung erreicht, was hauptsächlich auf die Obskurierung des zurückgeworfenen Lichtes durch die Probe selbst zurückzuführen ist. Dennoch liegt die Effizienzsteigerung hier bei dem 91 ± 22 -fachen des OPT Aufbaus. Dies wird auch deutlich bei dem Vergleich der Bildqualität der Abbildungen 6.3a und 6.3c miteinander. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass der OPT-Aufbau selbst bei den gleichen Beleuchtungsparametern mit dem selben Laser eine um zwei Größenordnungen höhere Bestrahlungsdosis für vergleichbare Ergebnisse benötigt.

Aus Gleichung (2.46) geht hervor, dass bei einer solchen Messung die Quanteneffizienz des Detektors berücksichtigt werden muss. Wird die dreifach höhere Quanteneffizienz der CCD-Kamera berücksichtigt ($QE_{\text{CCD}} = 60\%$ und $QE_{\text{PMT}} = 20\%$ für $\lambda = 600\text{nm}$), ergeben sich die erwarteten optischen Empfindlichkeitssteigerungen von dem 180 ± 45 -fachen ohne bzw. dem 273 ± 66 -fachen⁵ mit Reflektor, gegenüber der OPT. Durch Umformen von Gleichung (6.1) und der Kenntnis der NA des OPT-Vergleichsaufbaus ($NA = 0,037 \pm 0,003$) kann auf die zugehörige NA des Kollimators zurückgeschlossen werden: $NA_{\text{Kollimator}} = 0,49 \pm 0,10$, was sich mit dem bereits berechneten Wert von 0,46 deckt [Lor11c].

6.2.2. Geschwindigkeit

Die technischen Beschränkungen der eingesetzten Detektoren bzw. Scanner erlauben minimale Aufnahmedauern für die gesamte Messung von 12 Minuten 30 Sekunden bei dem SLOT und 21 Sekunden bei dem OPT Aufbau. Für den obigen Vergleich wurden allerdings jeweils zwei Sekunden Projektionsaufnahmezeit gewählt. Daher folgt für die in Abbildung 6.3 dargestellte Qualität der Einzelprojektionen eine Gesamtaufnahmedauer von ca. 20 Minuten bei beiden Systemen. Abgesehen von diesem speziellen Fall ist die Geschwindigkeit beider Verfahren jeweils unterschiedlichen Beschränkungen unterlegen. Zunächst können die aus Abschnitt 2.4.4 bekannten Eigenschaften der Detektoren untersucht werden. SLOT stellt ein sequenzielles Verfahren dar, wohingegen die OPT einen Arraydetektor verwendet, welcher eine Parallelisierung zwischen 5 und 7 Größenordnungen erlaubt. Erreicht das Licht den Arraydetektor mit einer genügend hohen Intensität, kann demnach ein OPT-System deutlich schneller

⁵Dies entspricht einer Sammeleffizienz von 4.4%

arbeiten als ein SLOT-System.

Zunächst ist die Geschwindigkeit, mit der ein Laserstrahl abgerastert werden kann, durch das Scansystem beschränkt. Galvanometrische Scanner erreichen hier eine Zeilenrate von 250 bis 1000 Hz und damit typische Pixelraten von ca. 0,25 bis zu 1 Megapixel pro Sekunde. Mikromechanische, akustooptische und Polygon-Scanner erreichen deutlich höhere Zeilenraten im Bereich von 1 kHz bis hin zu 140 kHz [Sch00a, Sch00b, Fri00, Sch01] und typische Pixelraten von 1 bis 32 Megapixeln pro Sekunde. Des weiteren lässt die Simulation aus Abschnitt 3.5.5 die Annahme zu, dass die Scangeschwindigkeit mit nichtmechanischen Ansätzen nahezu beliebig⁶ gesteigert werden kann. Da optische Detektoren Signale bis hin zu Gigahertz-Frequenzen aufnehmen können, bleibt zunächst die Fluoreszenzlebensdauer ein physikalisch relevanter Effekt, der nicht mit dem Apparat überwunden werden kann. Typische Fluoreszenzlebenszeiten liegen zwischen einer und zehn Nanosekunden [Lak06]. Wird als Abklingdauer die zehnfache Lebensdauer gewählt, was einem Unterdrückungsverhältnis von 1 zu 22.000 entspricht, ergibt dies eine Pixelrate von 10 MHz bis 100 MHz.

Da die Proben, wie schon in Abschnitt 2.5.2 festgestellt wurde, einen die Intensität beschränkenden Faktor darstellen, ist es sinnvoll die Systeme bei gleichen Beleuchtungsparametern zu vergleichen. In Transmissionsrichtung tragen in beiden Systemen nahezu alle Photonen zur Informationsgebung bei. Daher sind bei entsprechenden Scangeschwindigkeiten keine Unterschiede in der Aufnahmegeschwindigkeit zu erwarten. Jedoch ist zur Zeit der technische Aufwand unverhältnismäßig hoch und daher bei Transmissionsaufnahmen die OPT als schneller anzusehen. Bei Fluoreszenzaufnahmen geht aus dem obigen Abschnitt 6.2.1 hervor, dass ein OPT-System für gleichwertige Ergebnisse eine um zwei Größenordnungen intensivere Probenbestrahlung benötigen. Hierbei ist mit einem entsprechend schnelleren Ausbleichen des Farbstoffs in der Probe zu rechnen [Paw06]. Eine Extrapolation mit den obigen Aufnahmen auf 100 MHz Pixelrate zeigt, dass die OPT bereits 4 mW Bestrahlungsintensität benötigt, um lediglich ein SNR von 1 zu erreichen. Um dieselbe Qualität wie in den Messungen aus dem vorigen Abschnitt zu erhalten, müssten bereits 400 mW Bestrahlungsintensität genutzt werden. SLOTy benötigte lediglich 4 mW für gleichwertige Ergebnisse. 400 mW ist eine sehr hohe Leistung, die zumindest die Auswahl der Laserquellen einschränkt. Bei einer moderater Absorption führt sie zudem zu Probenschäden [Paw06]. Daher gilt, dass die OPT bei Verhältnissen wie in Abschnitt 6.2.1 beschrieben nicht sinnvoll schneller sein kann als SLOT.

6.2.3. Objektgröße

Theoretisch sind die Auflösungen und Abmessungen für SLOT und OPT nahezu identisch. Daher können beide für optische Mikroskopieverfahren relativ große Objekte darstellen. Abbildung 6.8 beispielsweise stellt ein Aufnahmevolumen von 6 mm Durchmesser und 27 mm Länge dar. Dennoch hat die OPT bei der Vergrößerung der Proben wieder einen entscheidenden Nachteil gegenüber der SLOTy. Die NA und

⁶Theoretisch ergeben sich Sampleraten in der Größenordnung von 10^7 Megapixeln pro Sekunde.

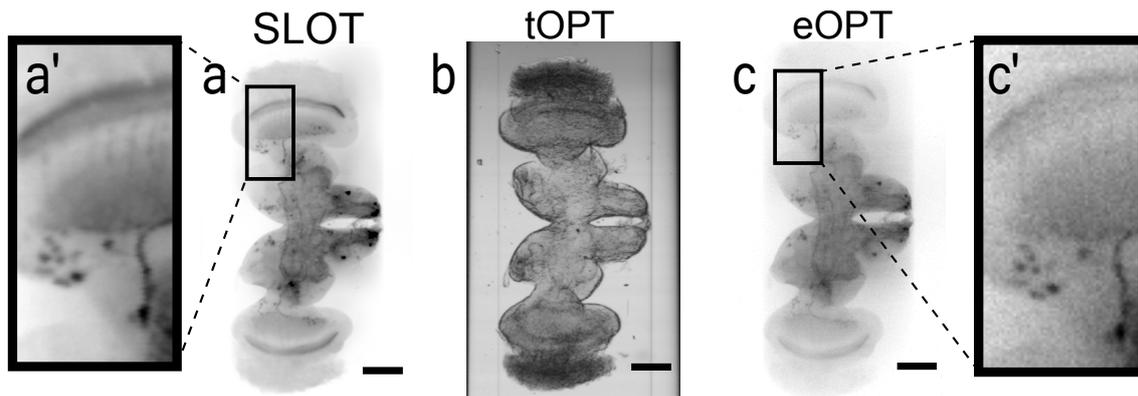


Abbildung 6.3.: Exemplarischer Vergleich der Aufnahmen von dem SLOT Versuchsaufbau mit dem OPT Versuchsaufbau [Lor11c]. Die Maststabsbalken entsprechen $300\ \mu\text{m}$. (a) Projektionsaufnahme mit dem SLOT. (b) Transmissionsaufnahme mit dem SLOT. (c) Projektionsaufnahme mit dem Emissions-OPT Aufbau.

damit auch die Detektionseffizienz muss weiter reduziert werden. Mit Gleichungen (2.43) und (6.1) kann dieser Sachverhalt berechnet werden.

$$\text{Empfindlichkeit}_{OPT} = \frac{1}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{2,12\lambda}{n\Delta z}} \right] \approx \frac{1,06\lambda}{2n\Delta z} \quad (6.2)$$

Die Näherung in Gleichung (6.2) zeigt, dass die Empfindlichkeit invers proportional mit der Tiefenschärfe Δz und damit auch der Probendicke abnimmt. Die OPT büßt somit, im Gegensatz zu SLOTy, bei einer Verdopplung der Probendicke die Hälfte ihrer Empfindlichkeit ein.

6.3. Optisches Aufklaren

Das chemische Aufklaren der Probe stellt einen entscheidenden Schritt in der Probenvorbereitung dar. Da die OPT und SLOTy große Proben aufnehmen können, ist es notwendig, die Proben optisch so aufzubereiten, dass diese Eigenschaft voll ausgeschöpft wird. Es existieren diverse Protokolle und Veröffentlichungen zu diesem Thema [Spa11, Ryl06, Dod07, Tuc07, McG07, Tse09]. Der allgemeine Ansatz ist das Wasser aus einer biologischen Probe mit einer anderen Flüssigkeit zu ersetzen, die einen höheren Brechungsindex aufweist oder Fette und Öle aus der Probe zu entfernen, um den Brechungsindex an den von Wasser anzugleichen [Spa11, Tuc07, Ham11]. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Aufklarungsreagenzien bzw. brechungsindexanpassende Flüssigkeiten eingesetzt: Glycerin und Silikonöle. Glycerin ist eine dickflüssige Flüssigkeit (Viskosität $\eta = 1412\ \text{mPas}$ bei 20°C)⁷, die sich beliebig mit Wasser mischen lässt und einen Brechungsindex von 1,47 besitzt. Dieser Brechungsindex reicht bei den untersuchten biologischen Proben nicht aus, um die Streuung

⁷Herstellerangabe Carl Roth

maximal zu unterdrücken. Dennoch zeichnet sich Glycerin bei Probendicken von bis zu einem Millimeter Dicke durch die einfache Handhabung aus. Alle Proben der *Locusta migratoria* wurden daher mit Glycerin aufgeklärt. Weiterhin kann über die Verdünnung mit Wasser ein gezieltes Streuverhalten erzielt werden. Da es sich mit Wasser mischen lässt, können alle auf Wasser basierenden Präparate direkt mit Glycerin aufgeklärt werden. Die Aufklarungsprozedur beinhaltet die Überführung zu der gewünschten Zielkonzentration des Glycerins in mehreren Verdünnungsschritten [Ste07, Lor11c]. Die eingesetzten Silikonöle AP150 ($n=1,507$), DC702 ($n=1,516$) und DC704 ($n=1,557$) besitzen eine, im Vergleich zu Glycerin, geringe Viskosität von 161 mPas⁸, 49 mPas⁹ bzw. 40 mPas¹⁰ bei einer Temperatur von 25°C. DC702 und DC704 lassen sich untereinander beliebig mischen, was das Einstellen eines Brechungsindex zwischen 1,516 und 1,557 erlaubt. Um eine Probe mit Ölen aufzuklären, muss zunächst das Wasser entfernt werden [Spa11, Dod07]. Dies wurde hier mit einer Ethanolreihe erzielt, die mit wasserfreiem Ethanol endet. Danach kann die in Ethanol überführte Probe mit der Silikonölmischung nach demselben Schema aufgeklärt werden, wie es bereits mit Glycerin geschah.

6.4. Kontrastmechanismen in der SLOTy und OPT

Neben der allgemeinen Beschreibung der Kontrastmechanismen in Kapitel 2 soll hier nun speziell auf die Ausprägungen und Eigenheiten der folgenden Mechanismen für SLOTy bzw. die OPT eingegangen werden.

6.4.1. Absorption bzw. Extinktion

Durch Transmissionsaufnahmen mit der Photodiode kann wie bei der Röntgen-CT auch die Extinktion, also die Abschwächung des transmittierten Lichts durch die Probe bestimmt werden. Als Basis hierfür dient wieder Gleichung (4.6), die die Umwandlung der Intensitätswerte in die zugehörigen Abschwächungen erlaubt. Die Rekonstruktion ergibt eine dreidimensionale Darstellung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon(x, y, z)$ (vgl. Abschnitt 4.1.2). Wichtig ist hier zu beachten, dass sich $\epsilon(x, y, z)$ aus dem Streukoeffizienten $\mu_S(x, y, z)$ und dem Absorptionskoeffizienten $\mu_A(x, y, z)$ zusammensetzt (vgl. Abschnitt 2.4.3).

$$\epsilon(x, y, z) = \mu_S(x, y, z) + \mu_A(x, y, z)$$

Als Testobjekt dient hier ein einfacher Bernstein, der sich in einer brechungsindexangepassten Flüssigkeit¹¹ befindet. Abbildung (6.4) zeigt den gleichen Stein mit jeweils unterschiedlicher Beleuchtung und Auswertung. Der Stein wurde zunächst bei den Wellenlängen von 532 nm und 635 nm durchleuchtet (Abbildung 6.4a und

⁸Herstellerangabe Wacker Chemie AG

⁹Herstellerangabe Dow Corning Corporation

¹⁰Herstellerangabe Dow Corning Corporation

¹¹41 % DC702 + 51 % DC704. Der daraus folgende Brechungsindex beträgt 1,54

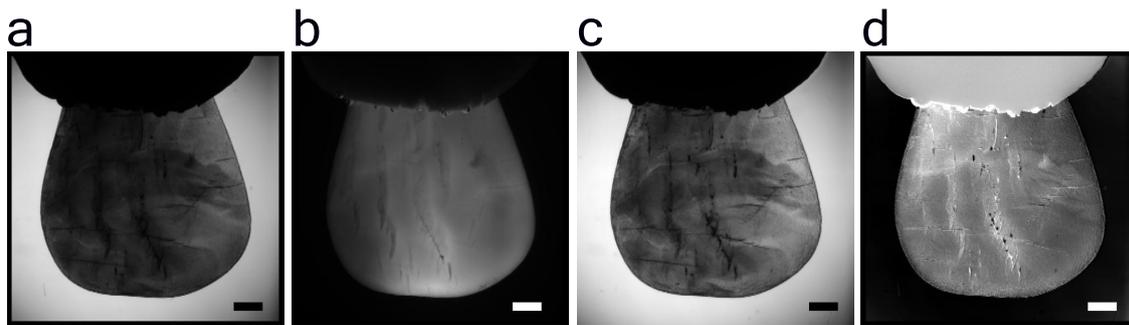


Abbildung 6.4.: Unpolierter Bernstein. Die Skalierungsbalken entsprechen einem Millimeter. (a) Transmissionsaufnahme bei einer Laserwellenlänge von 532 nm. (b) Fluoreszenzaufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm und einem 570 nm Kantenfilter (Schott OG-570 LP). (c) Transmissionsaufnahme bei einer Laserwellenlänge von 635 nm. (d) Differenz der logarithmierten Intensitäten aus (a) und (c).

6.4c). Dies dient dazu, die Farbeigenschaften des Steines, welche hauptsächlich durch Absorption hervorgerufen werden, bewerten zu können [Hei11]. Erwartungsgemäß ist die Transmission im Roten (Abbildung (6.4c)) bei dem im Tageslicht gelb bis rötlichen Stein höher als im Grünen (Abbildung (6.4a)). Parallel zur Transmission im Grünen konnte mit einem Kantenfilter (Schott OG-570 LP) vor dem PMT die Autofluoreszenz des Steines gemessen werden (Abbildung (6.4b)). Zuletzt wurde die Differenz der Extinktionen, bzw. des negativen Logarithmus der Intensitäten, des grünen und des roten Transmissionsbildes gebildet (Abbildung (6.4d)). Es fällt auf, dass die Fluoreszenz zum Teil ähnliche Strukturen wie die Differenzextinktion aufweist. Dies war zu erwarten, da die Fluorophore das Anregungslicht absorbieren und so auch zu der Absorptionaufnahme beiträgt. Dies zeigt, dass über die optische Extinktion Informationen über eine Probe gewonnen werden können, die ebenso viel oder auch mehr Details zeigen als eine Fluoreszenzaufnahme.

6.4.2. Brechung

In der optischen Tomographie ist Brechung ein eigentlich unerwünschter Effekt, da hierbei die Strahlen nicht entlang der theoretisch angenommenen Wege propagieren. Für hohe Numerische Aperturen geht dieser Effekt in Aberrationen, die durch die Probe hervorgerufen werden über (Abschnitt 2.5.2). Dennoch ist die Brechung von Strahlen gerade bei der Beurteilung einzelner Projektionen hilfreich um schwach brechende Strukturen hervorzuheben. Hierzu werden die beleuchtende NA des Laserstrahls und die detektierende NA der Photodiode aus dem SLOT Aufbau sehr klein ($NA < 0,03$) eingestellt. Somit können feine Strukturen hervorgehoben werden. Die Transmissionsaufnahme in Abbildung 6.5a wurde bei geöffneter Fotodiode und damit einer NA von $0,029 \pm 0,004$ erstellt. In Abbildung 6.5c wird deutlich, dass die Reduzierung der Apertur der Photodiode auf eine NA von $0,004 \pm 0,0006$ feine Strukturen deutlich hervorhebt, die zuvor nicht sichtbar waren. Der eingesetzte Re-

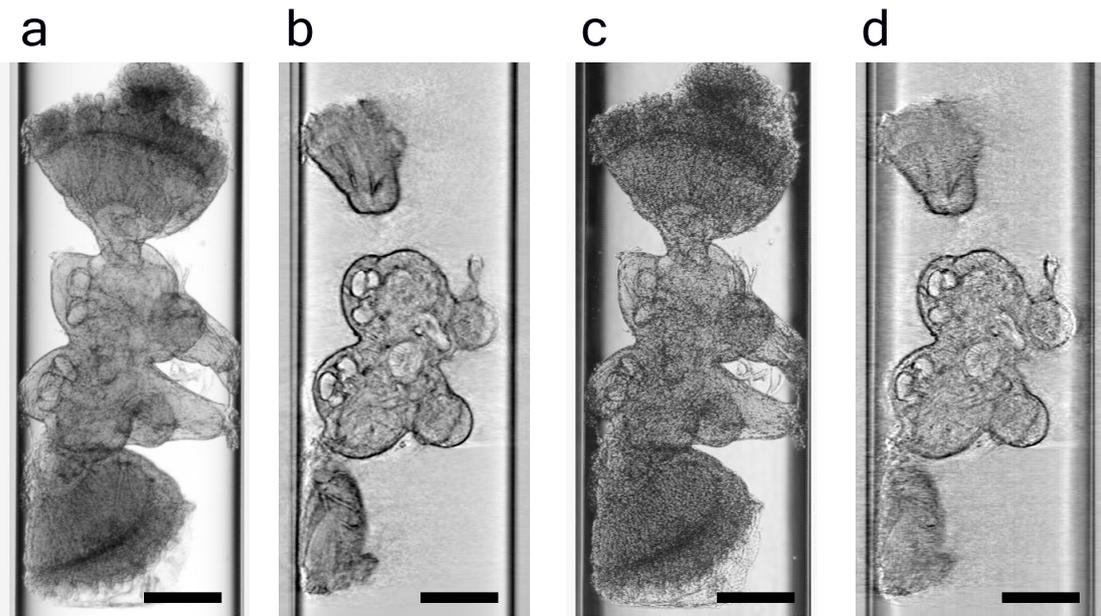


Abbildung 6.5.: Transmissionsaufnahmen eines Heuschreckengehirns mit optischen Loben im L1 Entwicklungsstadium. Die Skalierungsbalken entsprechen 500 μm . (a) Transmissionsaufnahme bei einer Detektions-NA der Photodiode von $0,029 \pm 0,004$. (b) Rekonstruktion der Daten aus (a). (c) Transmissionsaufnahme bei einer Detektions-NA von $0,004 \pm 0,0006$. (d) Rekonstruktion der Daten aus (c).

konstruktionsalgorithmus ist allerdings nicht in der Lage, die zusätzliche Information in der Rekonstruktion zu nutzen. Während in der Schnittebene aus Abbildung 6.5b die einzelnen Regionen des Insektengehirns gut unterscheidbar sind, ist in Abbildung 6.5d ein störender Hintergrund zu erkennen. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist, dass die feineren Strukturen nicht aus allen Blickwinkeln zu erkennen sind und daher eine korrekte Rekonstruktion unmöglich wird. Zusammenfassend stellt sich heraus, dass durch die Reduktion der NA die Empfindlichkeit gegenüber Brechungseffekten erhöht werden kann. So können zuvor nicht sichtbare Strukturen beobachtet werden. Dies lässt sich in den untersuchten Fällen allerdings nicht sinnvoll Rekonstruktion und ist somit zunächst lediglich als zusätzliche Aufnahmemodalität anzusehen.

6.4.3. Streuung

Neben der Extinktion bzw. der Kombination aus Streuung und Absorption kann auch die Streuung von Licht am Objekt getrennt untersucht werden (vgl. Unterabschnitt 2.5.2). Hierzu wird das Anregungslicht nicht mit einem Filter vor dem PMT entfernt, was Streulicht auf diesen fallen lässt. Im Gegensatz zur Brechung wird hier mit einem großen Öffnungswinkel detektiert. Alternativ zu dem Aufbau aus Abbildung 6.1a hat es sich als vorteilhaft erwiesen, den PMT unterhalb der Probe anzubringen um die Detektion von Reflexionen an der senkrechten Kapillare zu unterdrücken [Hei11].

Das Ergebnis einer solchen Messung an einem Heuschreckengehirn der Art *Locusta*

migratoria ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Die einzelnen anatomischen Strukturen des Gehirns sind im Streulichtbild unterscheidbar. Dies wurde bei der Analyse der Pilzkörper und Antennalloben von René Eikhoff genutzt [Eic]¹². Ein Problem dieser Aufnahmen liegt in der Anfälligkeit gegenüber Reflexionen. Insektengehirne sind typischerweise durchsetzt mit feinen Luftkanälen zur Zellversorgung, sogenannten Tracheen. Diese bilden auf Grund des Übergangs von einem hohen (Flüssigkeit) zu einem niedrigen (Luft) Brechungsindex totalreflektierende Strukturen aus. Zudem neigen sowohl die Tracheen als auch die Flüssigkeit selbst dazu Gas abzugeben das sich in feinen Gasblasen sammelt. Diese sind wiederum starke Reflektoren und für ein tomographisches Verfahren praktisch undurchsichtig.

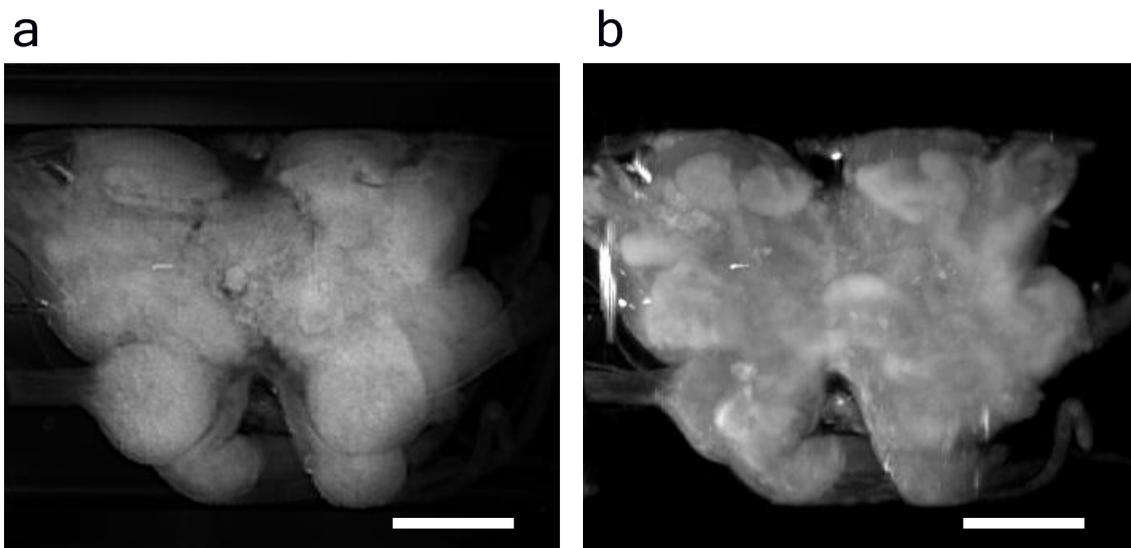


Abbildung 6.6.: Streubildaufnahmen des Gehirns einer adulten *Locusta migratoria*. Die Skalierungsbalken entsprechen 500 μm . (a) Einzelne Projektionsaufnahme. (b) Maximumintensitätsprojektion (maximaler Wert entlang der projizierten Achse) der rekonstruierten Daten aus (a).

Hierdurch entstehen bei der inversen Radontransformation Streifenartefakte, auf die bereits in Kapitel 5 eingegangen wurde. In Abbildung 6.6b äußert sich dies durch den übersteuerten Streifen in der linken Bildhälfte. Trotz dieser Schwierigkeiten handelt es sich bei der Streuung um einen intrinsischen also der Probe innewohnenden Kontrastmechanismus. Er ist im Gegensatz zu Färbungen somit im ganzen Objekt verfügbar und wie Abbildung 6.6 zeigt in der Lage anatomische Strukturen darzustellen.

6.4.4. Fluoreszenz

Die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen birgt das vermeintlich größte Potential in der Lichtmikroskopie, da die chemischen bzw. biochemischen Eigenschaften und

¹²Die Veröffentlichung befindet sich zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Dissertation in Vorbereitung.

Prozesse der Probe sichtbar und sogar messbar gemacht werden können [Sha02, Sha03b, Hui04, Hei05, Paw06, Ste07, Dod07, Hui09, Küt10, Lor11c]. Abbildung 6.7 stellt ein Beispiel hierfür dar. Dargestellt ist eine Serotoninantikörperfärbung an dem Gehirn einer *Locusta migratoria* im ersten Larvenstadium (L1). Im Gegensatz zu Abbildung 6.6 sind die optischen Loben noch vorhanden. Im direkten Vergleich wird deutlich, dass eine Fluoreszenzfärbung Strukturen deutlich selektiver als die Streuung aufzulösen vermag. Einzelne Zellen können als helle Punkte identifiziert werden. In diesem Zusammenhang ergibt sich auch der größte Unterschied zwischen der OPT und SLOT. Fluoreszenzfarbstoffe neigen dazu auszubleichen, was von der Bestrahlungsintensität, aber auch von der Bestrahlungsdauer abhängt. Auf Grund der hohen Effizienz ist dieser Effekt für SLOTy in den meisten Fällen sehr klein und daher nur in der OPT von Relevanz. Bei der Antikörperfärbung von größeren Strukturen fällt zudem auf, dass ein in der Histologie genutztes Färbeprotokoll nicht die gesamte Struktur gleichmäßig anfärben kann.

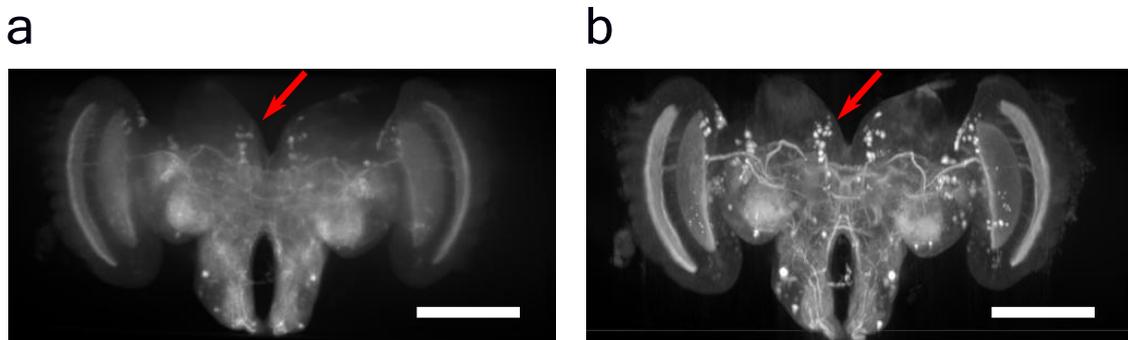


Abbildung 6.7.: Fluoreszenzaufnahmen des Gehirns der *Locusta migratoria* im L1 Stadium. Einzelne Zellen sind als helle Punkte identifizierbar (roter Pfeil). Die Skalierungsbalken repräsentieren 500 μm . (a) Einzelne Projektionsaufnahme. (b) Maximumintensitätsprojektion (maximaler Wert entlang der Projizierten Achse) der rekonstruierten Daten aus (a).

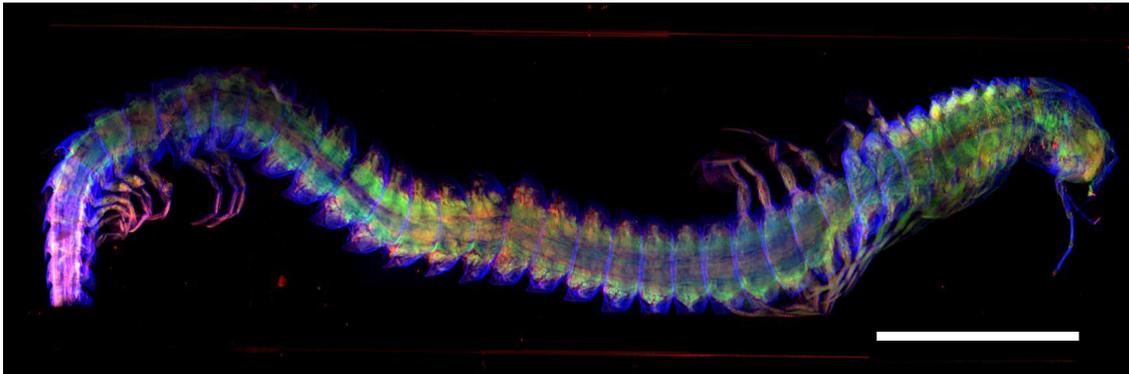
Adulten Gehirnen (ähnlich denen in Abbildung 6.6) zeigten bereits Färbungsartefakte, was zentrale Strukturen übermäßig dunkel erscheinen lässt. Um einen entsprechend großen oder auch größeren Organismus zu färben ist es möglich, in dessen Gene GFP-codierende DNS einzuschleusen, die daraufhin eine Expression des Farbstoffs vor Ort bewirkt.

6.4.5. Autofluoreszenz

Abbildung 6.7 zeigt nicht nur die serotoninproduzierenden Strukturen der zentralen Nervensystems (ZNS) der *Locusta migratoria*, sondern auch, deutlich schwächer, das gesamte Gehirn. Hierfür gibt es zwei Ursachen. Die eine liegt in einer nicht 100 %-igen Selektivität der Antikörper, was zu einer Färbung an den falschen Orten führt [Paw06, Fri08, Lor08]. Die andere ist eine durch die biochemische Zusammensetzung dem Gewebe eigene Autofluoreszenz [Con04, Paw06, McG08, McG11]. Abbildung

6.8 zeigt einen Wasserkrebs der Gattung *Godzilliognomus* in einer Dreikanalfalschfarbendarstellung. Der Krebs wurde mit dem Silikonöl AP150 aufgeklart. Der rote Kanal wurde durch die Messung von Streulicht bei 635 nm Wellenlänge gewonnen. Der blaue (Anregung bei 405 nm Detektion bei $\lambda > 435$ nm LP) und der grüne Kanal (Anregung bei 532 nm Detektion bei $\lambda > 557$ nm LP) sind durch die Detektion der Autofluoreszenz der Probe erzeugt worden. Der blaue Kanal zeigt deutlich den Panzer des *Remipedia*, wohingegen der grüne Kanal einzelne Muskelfasern auflöst.

a



b caudal

cranial

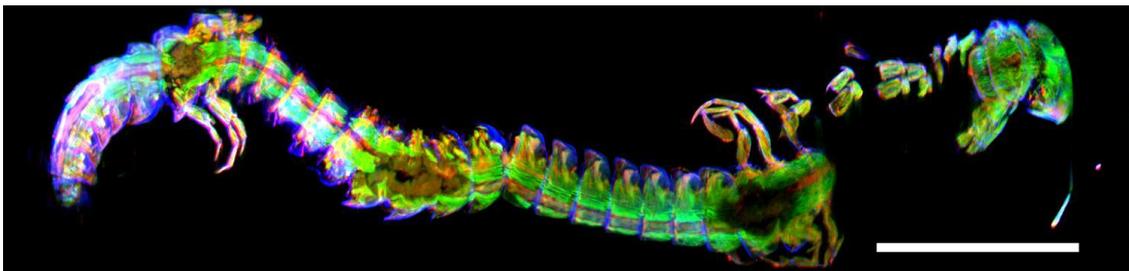


Abbildung 6.8.: Autofluoreszenzaufnahme eines *Godzilliognomus*. Der Kopf liegt auf der rechten Seite. Die Skalierungsbalken entsprechen 5 mm. (a) Einzelne Projektionsaufnahme. (b) Maximumintensitätsprojektion (maximaler Wert entlang der Projizierten Achse) der Rekonstruierten Daten über eine ausgewählte Schicht mit einer Dicke von 560 μm .

Diese Aufnahmen zeigen, dass eine vorherige Färbung der Probe nicht zwingend notwendig ist, um mehrere unterschiedliche anatomische Strukturen voneinander zu trennen und aufzulösen.

6.5. Diskussion

Allgemein kann festgehalten werden, dass durch die gezielte Nutzung und Kombination des Beleuchtungskanal mit dem Detektionskanal (vgl. Kapitel 2) ein optisches System wie die in der OPT üblichen Anordnungen in seinen Eigenschaften drastisch verbessert werden kann. Von den Parametern aus Kapitel 2 wurden die Empfindlichkeit, die Geschwindigkeit und Kontrastmechanismen näher, die Probengröße und

Auflösung hingegen nicht näher untersucht. Es zeigten sich allerdings auch keine auffälligen Unterschiede zwischen den Systemen. Die Probengröße ist hauptsächlich durch die bildgebende Linse beschränkt und Abbildung 6.8 zeigt, dass mit den richtigen Optiken drei Zentimeter lange Proben keine Probleme bereiten. Die Auflösung des SLOT sollte auf Grund der kürzeren Wellenlänge des bildgebenden Kanals nach Formel (2.42) theoretisch geringfügig über der der OPT liegen. Daher wird an dieser Stelle auf Kapitel 4 verwiesen. Als Systemeigenschaften wurden sowohl Aberrationen als auch die Polarisation nicht untersucht. Aberrationen wurden nicht näher verfolgt, da die simulierte und die gemessenen Auflösungseigenschaften nahe genug beieinander liegen (Abbildung 4.7), so dass hier kein relevantes Optimierungspotential besteht. Bei dem Übergang von Optiken in Luft zu der brechungsindexanpassenden Flüssigkeit treten üblicherweise sphärische Aberrationen auf [Hel03], diese werden allerdings erst für weitaus höhere numerische Aperturen, als in der optischen Tomographie üblich, relevant [Hel03]. Polarisationseffekte wurden nicht untersucht, da dieses Anwendungsgebiet, zwar theoretisch möglich allerdings in der OPT unüblich ist und daher ein Vergleich keinen relevanten Nutzen hätte.

Es stellt sich vielmehr heraus, dass bei einer Anordnung wie bei einem SLOT der Hauptunterschied zur OPT in der um mehrere Größenordnungen gesteigerten Empfindlichkeit liegt. Es lässt sich sogar extrapolieren, dass wenn die Probendicke von einem Millimeter aus meiner Veröffentlichung [Lor11c] auf sechs Millimeter wie bei dem *Godzillioognomus* vergrößert wird, der SLOT bei einem genügend großen Detektor rein optisch ungefähr um drei Größenordnungen mehr Photonen sammelt als ein OPT-Aufbau. Hierdurch steigt die maximale Anzahl nutzbarer Photonen drastisch an (vgl. Abschnitt 2.5.2). Die ineffiziente Detektion in der OPT und die Beschränkung der Anregungsintensität durch die Probe oder die Lichtquelle verhindern, den potentiellen Geschwindigkeitsvorteil gegenüber SLOTy sinnvoll zu nutzen. Bei Transmissionsaufnahmen kann die Abtastrate des SLOT weiter erhöht werden, womit auch hier kein essentieller Nachteil gegenüber der OPT existiert. Die erreichbaren Probengrößen beider Verfahren sind zwar identisch, allerdings zeigt auch hier die Empfindlichkeit von SLOTy gegenüber der OPT klare Vorzüge. Auch die maximale Anzahl nutzbarer Photonen in SLOTy erhöht sich zwangsläufig gegenüber der OPT. Hier kommt hinzu, dass die Homogenisierung der Beleuchtung in der OPT (vgl. Abbildung 4.5) stets schwieriger ist als bei SLOTy (vgl. Abbildung 6.3).

Neben diesen physikalischen Unterschieden ist noch ein weiterer technischer Aspekt hervorzuheben. PMTs besitzen eine deutlich geringere Quanteneffizienz als CCD- oder CMOS-Chips. Hierdurch muss der rein optische Vorteil relativiert werden, was die Effizienz effektiv um ein Drittel absenkt¹³. Allerdings sind bei CCD und CMOS-Chips alle Detektionseinheiten nicht perfekt identisch und führen so zu leichten systematischen Schwankungen in den Projektionsaufnahmen, die sich in Form von Ringartefakten äußern [Wal05, Bir11]. Dies wird mit einem PMT generell vermieden.

Will man nun sowohl die OPT als auch SLOTy mit anderen optischen Mikroskopietechniken vergleichen, können die in Abschnitt 2.5 beschriebenen Größen untersucht

¹³Der genutzte PMT (R6357, HAMAMATSU Photonics) besitzt eine QE von 20 % bei 600 nm Wellenlänge, die emCCD Kamera (Andor LucaR) eine QE von 60 % bei 600 nm Wellenlänge.

werden. Zunächst ist festzuhalten, dass ein vollständiger quantifizierter Vergleich anhand der publizierten Bilddaten anderer Arbeitsgruppen nicht möglich ist, da für Fluoreszenzaufnahmen keine standardisierten Bedingungen vorgegeben werden. Daher kann der Vergleich lediglich auf theoretischen Beschreibungen sowie vereinzelt Messdaten anderer Gruppen beruhen.

Als vergleichbare Techniken bieten sich die Lichtblattmikroskopie (LSBM), die konfokale laserscannende Mikroskopie (CLSM) und optische Kohärenztomographie (OCT) an. Da SLOTy mit der OPT bereits verglichen wurde, wird für den weiteren Vergleich auf die OPT verzichtet. Um die Überschaubarkeit zu wahren, wird zu jeder Eigenschaft aus Abschnitt 2.5 meist nur eine der genannten Techniken exemplarisch zum Vergleich herangezogen.

Die mit SLOTy erreichbare Auflösung hängt in der Grundkonfiguration von der Probengröße ab und ist anderen Mikroskopietechniken nahezu immer unterlegen. Lediglich die auf Streuung spezialisierte OCT arbeitet auch bei radialen Auflösungen zwischen 5 und 20 μm . Wie Abschnitt 4.3 zeigt existiert allerdings noch Potential zur Verbesserung des Auflösungsvermögens. Die Aufnahmegeschwindigkeit von SLOTy ist mit der sequenzieller Techniken wie der CLSM vergleichbar. Hier gibt es mittlerweile Systeme, die 7,5 Megapixel pro Sekunde aufnehmen [Mat10]. Andere Techniken nutzen Zeilen- oder Matrixdetektoren und können hierdurch deutlich schneller werden. Die Reaktion auf Hintergrundsignale wie z.B. Autofluoreszenz, die durch die Probe selbst verursacht werden stellt die stärkste Einschränkung von SLOTy dar. Durch den schrotrauschbegrenzten Hintergrund wird wie mit Formel (2.48) beschrieben, ein zusätzliches Rauschsignal auf die eigentliche Information addiert. Alle anderen dreidimensionalen Techniken die hier zum Vergleich stehen unterdrücken solche Hintergrundsignale deutlich effizienter. In Abschnitt 6.4.2 wurde bereits deutlich, dass Brechungen die durch die Probe hervorgerufen werden sich störend auf die Rekonstruktion auswirken. Allerdings gehen diese bei höheren Numerischen Aperturen in Aberrationen über, die noch mit Zernikesummanden (vgl. Abschnitt 3.5.1) niedriger Ordnungen repräsentiert werden können [Sch04]. Da lediglich die OCT eine vergleichbar kleine NA verwendet, relativiert dieser Effekt die Vorteile der Auflösung und der effektiven Empfindlichkeit bei den LSM und CLSM (vgl. Abschnitt 3.5.1). Die Notwendigkeit die Probe um 360° drehen zu können bedingt, dass die Probe nicht aus dem Aufnahmevolumen austritt. Andere einseitige Techniken wie die OCT erlauben es auch an einem großen Objekt kleinere Volumina zu untersuchen. Dies ist z.B. bei der Haut- oder Augenuntersuchung am menschlichen Patienten notwendig. Bei Proben, die dünn genug sind um mit einem SLOT aufgenommen zu werden, ist es allerdings ein Vorteil alle Blickwinkel zu nutzen, da hierdurch Abschattungseffekte reduziert werden.

Demgegenüber stehen die Eigenschaften, in denen SLOTy gleichgestellt bis hin zu überlegen ist. Das erreichbare Sichtfeld kann, wie in Abschnitt 6.4.5 gezeigt wurde, 30 mm bei einer Probenbreite und -tiefe von 6 mm überspannen und ist damit den anderen Techniken praktisch überlegen. Weiterhin ist die erzielte Empfindlichkeit und damit die Anzahl der nutzbaren Photonen sehr hoch. Es wurde zwar lediglich eine optische Sammeleffizienz von 4.4% im Versuch nachgewiesen, jedoch sind

theoretisch höhere Werte bis hin zu 90 % technisch realisierbar. Dies macht das Testsystem bereits ebenbürtig zu der sehr empfindlichen LSM und bei den theoretisch erreichbaren Effizienzen allen drei anderen Techniken überlegen. Systembedingte Aberrationen treten wiederum keine auf, da die genutzten Numerischen Aperturen ähnlich wie bei den durch die Probe induzierten Aberrationen zu klein sind um einen signifikanten Effekt zu erzielen. Dies gilt ebenso für die OCT. Die LSM und die CLSM benutzen wiederum hohe Aperturen, die systembedingt z.B. sphärische Aberrationen begünstigen. Ein dafür ausgelegtes SLOT System ist prinzipiell in der Lage die eingestrahlte Polarisation zu kontrollieren und die transmittierte Polarisation zu analysieren. Genauso kann unter der Einschränkung der Streu- und Fluoreszenzlichtdetektion auf abbildende Linsen die Polarisation des Streu- bzw. Fluoreszenzlichts analysiert werden. Hierbei stellt die Analyse der transmittierten Polarisation ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber den anderen Techniken dar. Ob diese Information auch dreidimensional ausgewertet werden kann bleibt noch offen. Die letzte Systemeigenschaft aus Abschnitt 2.5 ist die Nutzung des optischen Spektrums, welches bei SLOT sowohl im Beleuchtungs- als auch im Detektionskanal voll ausgeschöpft werden kann. Dies gilt auch für die LSM und CLSM. Lediglich die OCT ist darauf angewiesen den gleichen Spektralbereich im Beleuchtungs- und im Detektionskanal zu nutzen. Dies liegt daran, dass die Kohärenzzeit der Streuung (vgl. Abschnitt 2.5.2) und die Laufzeit des Lichts zur Ortsdetektion genutzt werden.

Es stellt sich somit heraus, dass die größten Schwächen von SLOTy gegenüber den anderen dreidimensionalen Mikroskopietechniken in der niedrigen Auflösung und dem hohen durch die Probe selbst verursachten Hintergrundsignal liegen. Diese können durch eine künstliche Auflösungserhöhung wie in Abschnitt 4.3 und selektive Färbetechniken wie in Unterabschnitt 6.4.4 zumindest teilweise kompensiert werden. In allen anderen Punkten ist SLOTy mit einer oder mehreren der anderen Technik mindestens ebenbürtig, wohingegen das Sichtfeld und die Empfindlichkeit das höchste Potential und gleichzeitig Alleinstellungsmerkmale unter den anderen Techniken darstellen.

7. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Bevor extrapoliert wird, welche Arbeitsfelder und Forschungsvorhaben aus dieser Arbeit entstehen und entstehen könnten, ist es hilfreich, die wichtigsten Punkte noch einmal zusammenzufassen:

Das Wissen über die Berechnung, Beschreibung und numerische Simulation von optischen Fernfeldsystemen (Mikroskopen) wurde genutzt, um ein bestehendes optisches Verfahren - die optische Projektionstomographie - zu optimieren. Das Ergebnis ist die scannende laseroptische Tomographie (SLOTy). Parallel wurde ein neues Rekonstruktionsverfahren zur Optimierung der rekonstruierten Daten - die Sinogrammauswertung - eingeführt.

Die Feststellung, dass optische Systeme, die auf Fernfeldern beruhen, am besten mit der Wellengleichung zu beschreiben sind, ist an und für sich nichts Neues. Auch die grundlegenden Eigenschaften einer Fouriertransformation und die Beschreibung von optischen Systemen anhand ihrer kohärenten Transferfunktion (CTF) werden bereits seit langem genutzt, um optische Systeme zu analysieren [Nak90, Gu00, Why05]. Allerdings stellt sich heraus (Kapitel 2), dass nur die Verbindung zwischen Wellengleichung und CTF ein grundlegendes Verständnis über die Möglichkeiten von Fernfeldsystemen erlaubt, ohne gegebenenfalls Aspekte zu vernachlässigen. Die CTF erlaubt es, die üblichen Mikroskopiesysteme in diese „vollständige“ Darstellung zu übertragen (Abschnitt 3.2). Dies ermöglicht zwei Dinge. Das Erste ist die gezielte Manipulation der CTF durch optische Elemente, um ihre Eigenschaften zu verändern. Hierzu zählt z.B. das Arbeitsfeld der „Superresolution“-Mikroskopie mit Phasen- und Amplitudenmasken, aber auch die spektral abhängige Ausleuchtung der hinteren Fokusaertur (Abschnitte 3.5.4 und 4.3). Umgekehrt erlaubt eine vollständige Darstellung, „unmögliche“ Eigenschaften bereits früh zu erkennen. Gründe hierfür können z.B. die mathematischen Eigenschaften einer Fouriertransformation oder die Anzahl der maximal erlaubten Freiheitsgrade sein. Entwicklungspotential für ein optisches System existiert bei einer CTF, die nicht bereits das gesamte Lichtfeld nutzt. Ihr können weitere (möglichst nicht überschneidende) CTFs in den 4-dimensionalen Raum (k_x, k_y, k_z, ω) hinzugefügt und somit weitere optische Kanäle erschlossen werden (vgl. Abschnitt 2.5.3 und Kapitel 6). Dies wird für den größten Teil der modernen Mikroskopie auf vielfältige Weise genutzt. Bei der STED-Mikroskopie z.B. werden CTFs mit unterschiedlichen Phasenmasken und Wellenlängen kombiniert. SLOT nutzt unterschiedliche Aperturen und Wellenlängen. Die konfokale Mikroskopie nutzt zwei sich im k-Raum genau gegenüberstehende CTFs unterschiedlicher Wellenlänge. Alle diese Techniken profitieren gegenüber dem „einfachen“ Lichtfeld in ihren

Eigenschaften durch die gezielte Nutzung mehrerer optischer Kanäle.

Dies trifft nicht auf die optische Projektionstomographie zu. Es werden zwei optische Kanäle genutzt: Der eine Kanal zur homogenen Beleuchtung und ein zweiter Kanal zur Detektion. Für ein tomographisches Verfahren wird allerdings nicht das Optimum aus den beiden Kanälen gezogen. Die Ursache liegt in der Kopplung der Auflösung mit der Detektionseffizienz (Abschnitt 6.2.1). Für die Projektionen ist eine hohe Tiefenschärfe und damit eine geringe numerische Apertur notwendig. Diese führen zu einer Minderung der Detektionseffizienz. Durch einen laserscannenden Aufbau ist es möglich, die Auflösung und die Detektion auf die beiden Kanäle neu zu verteilen (Abschnitt 6.1). Hierzu wird die Auflösungsenergie in den bereits benötigten Beleuchtungskanal verschoben und der Detektionskanal nach den technischen Möglichkeiten auf eine effiziente Detektion optimiert. Für die OPT konnte gezeigt werden, dass die Auflösung des Systems durch Besselstrahlen gesteigert werden kann (Abschnitt 4.3). Diese Prinzip muss folglich auf den auflösungsgenerierenden Beleuchtungskanal übertragen werden, um es auch für SLOTy zu nutzen. Es müsste ein Besselstrahl Laserfokus generiert werden. Hierfür wird üblicherweise ein Axikon eingesetzt [Duf06, Tsa07, Akt08, Brz08]. Gegenüber der OPT sind jedoch einige Eigenschaftsänderungen zu erwarten. Die Ausleuchtung der ringförmigen Apertur ist nicht mehr abhängig von der Position und Probenausleuchtung (Abschnitt 4.3.1). Im Gegenteil: Abschattungseffekte fallen bei Besselstrahlen weniger stark ins Gewicht als bei der gewöhnlichen Strahlpropagation [Fah10]. Weiterhin kompensiert die gesteigerte Empfindlichkeit den erhöhten Hintergrund, welcher bei der OPT einen Einsatz zur Fluoreszenzdetektion bereits ausschloss (Abschnitt 4.4).

Sind alle optischen Optimierungsmaßnahmen ausgeschöpft, besteht bei rekonstruierenden tomographischen Verfahren noch die Möglichkeit, die Auswertung der Rohdaten zu optimieren. Das hier eingeführte Verfahren der Sinogrammauswertung ermöglicht die differenzierte Untersuchung der Rohdaten im Bezug auf jeden einzelnen Volumenpunkt (Abschnitt 5.7). Neben der Eliminierung von Artefakten (Abschnitt 5.5.1) erlaubt dieser Ansatz, zusätzlich Eigenschaften der Strahlpropagation und der Rekonstruktionsqualität abzuleiten (Abschnitte 5.5.2 und 5.5.3). Hier eröffnet sich ein komplett neues Arbeitsgebiet, in dem noch viele weitere Algorithmen erprobt werden können.

Ausgehend von diesem Wissen bestehen einige Möglichkeiten, in weiteren Schritten neue Verfahren und darüber auch neues Wissen zu erschließen.

Zunächst ist die Vollendung der Fokussimulation (Kapitel 3) zu nennen. Hier können durch die korrekte Erstellung von CTFs Fokusfelder beschrieben werden, die in doppelbrechenden Medien auftreten. Dies kann für die Generierung höherer harmonischer Lichtfelder in doppelbrechenden Kristallen aber auch für Saphirkristalle in TiSa-Lasersystemen, die auch Doppelbrechung aufweisen, von Interesse sein. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass nicht lineare Effekte nicht berücksichtigt werden können. Die Generierung höherer harmonischer Lichtfelder kommt einer Dämpfung des erzeugenden Lichtfeldes gleich, welche bereits in Abschnitt 2.1 aus der Beschreibung ausgeschlossen wurde. Der Kerr-Linseneffekt verletzt die Bedingung eines homogenen Mediums. Hier könnte die Fokussimulation für Zeitpunkte vor der nichtlinearen

Wechselwirkung genutzt werden und daraufhin einen komplexeren Simulationsansatz initialisieren. Ist der nichtlineare Effekt beendet, kann die weitere Propagation mit der hier entwickelten Simulation stattfinden. Andere CTF-Funktionen, die noch durch kein bekanntes optisches Element generiert werden, können auch mit der hier entwickelten Simulationsmethodik auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. In ihrem jetzigen Zustand kann die Fokussimulation allerdings noch weitere Einblicke in den zeitlichen Ablauf der Lichtfelder von fs-Fokussen liefern. Im Speziellen scheinen die spektralen Eigenschaften der Ausleuchtung der hinteren Fokusebene viele Möglichkeiten der zeitlichen Beeinflussung zu ermöglichen. Als Beispiel sei der spektrale Besselstrahl genannt (Abschnitt 3.5.4), der nach der eigentlichen Fokussierung wieder über die komplette Tiefe hinweg defokussiert wird. Die zeitliche Defokussierung hängt mit dem linearen Verhältnis zwischen Frequenzen und Wellenlängen im freien Raum zusammen. In einem Medium, das ein deutlich steileres Brechungsindexverhalten aufweist, könnte dieselbe CTF im k-Raum mit einem schmaleren und damit zeitlich stabileren Spektrum erzeugt werden. Der längliche Fokus wäre örtlich und zeitlich nahezu stabil. Solch ein Fokus hätte praktisch ideale Eigenschaften für die optisch tomographische Bildgebung und damit auch SLOTy.

SLOTy könnte durch das geringe Beleuchtungsvolumen auch nichtlineare Effekt nutzen. Hier steht die Multiphotonenmikroskopie im Vordergrund. Durch die quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der anregenden Spitzenintensität werden die Nebenmaxima unterdrückt und die effektive MTF des Besselstrahls verbessert sich. Um ähnliche Spitzenintensitäten wie bei der herkömmlichen Multiphotonenmikroskopie zu erhalten, ist die Nutzung eines Lasers mit einer mäßig hohen Repetitionsrate von einem bis hin zu zehn Megahertz und einer Pulsdauer unterhalb von 200 fs zu empfehlen. Hierdurch kann die gegenüber dem normalen Fokus reduzierte Spitzenintensität kompensiert werden, ohne zu hohe Durchschnittsleistungen und damit Erwärmungsraten zu benötigen [Paw06]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Sammeleffizienz noch weiter zu steigern. Bis jetzt konnten knapp 5 % Sammeleffizienz erzielt werden (Abschnitt 6.2.1). Technisch gesehen gibt es nahezu keine Beschränkung der Detektionseffizienz, wodurch auch mehr als 90 % der Photonen detektierbar sein sollten. Ein einfacher Ansatz hierfür, wäre so viele Detektionseinheiten hinzuzufügen, bis 90 % aller Emissionsrichtungen abgedeckt werden. Dass gemessene Signal der Einzeldetektoren kann dann elektronisch wieder vereinigt werden. Zusammen mit neuen Beleuchtungskonzepten könnte so die Bernoulliverteilung aus Abschnitt 2.2.2 zum tragen kommen und das SNR gesteigert werden.

Im letzten Schritt würde durch die Kombination existierender Rekonstruktionsmethoden wie z.B. iterativer Algorithmen mit der Sinogrammauswertung die Auswertung der Daten noch komplexer und damit selektiver gestaltet werden. Somit wären alle in dieser Arbeit erfassten Methoden genutzt um die maximale Leistungsfähigkeit mit dem Prinzip der optischen Tomographie zu erzielen.

Abschließend möchte ich mich einer Aufforderung von Sherlock Holmes anschließen: „You know my methods. Apply them.” (Arthur Conan Doyle, „The Sign of the Four” (1890), Chapter 6)

Quellen

- [Abb80] E. Abbe. Some remarks on the apertometer. *Journal of the Royal Microscopical Society*, **III**:20–31, 1880.
- [Abb04] E. Abbe. Gesammelte Abhandlungen von Ernst Abbe - Erster Band - Abhandlungen über die Theorie des Mikroskops. Gesammelte Abhandlungen von Ernst Abbe. Verlag von Gustav Fischer Jena, 1904.
- [Aes10] E. Aescht, S. Bächl-Zimmermann, A. Burmester, S. Dänhardt-Pfeiffer, C. Desel, C. Hamers, G. Jach, M. Kssens, J. Makovitzky, M. Mulisch, B. Nixdorf-Bergweiler, D. Pätz, Dätz, B. Riedelsheimer, F. Boom, R. Wegerhoff, U. Welsch, E. Aescht, S. Bächl-Zimmermann, A. Burmester, S. Dänhardt-Pfeiffer, C. Desel, C. Hamers, G. Jach, M. Käsens, J. Makovitzky, M. Mulisch, B. Nixdorf-Bergweiler, D. Pätz, B. Riedelsheimer, F. Boom, R. Wegerhoff, U. Welsch. Mikroskopische Verfahren. Spektrum Akademischer Verlag, 2010.
- [Akt08] S. Akturk, B. Zhou, B. Pasquiou, M. Franco, A. Mysyrowicz. Intensity distribution around the focal regions of real axicons. *OPTICS COMMUNICATIONS*, **281**(17):4240–4244, 2008.
- [Alb00] O. Albert, L. Sherman, G. Mourou, T. B. Norris, G. Vdovin. Smart microscope: an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy. *Opt. Lett.*, **25**(1):52–54, 2000.
- [All11] All nobel prizes at http://nobelprize.org/nobel_prizes/lists/all/, 2011.
- [Amb73] J. Ambrose. Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 2. clinical application. *Br J Radiol*, **46**(552):1023–1047, 1973.
- [And84] A. Andersen, A. Kak. Simultaneous algebraic reconstruction technique (sart): A superior implementation of the art algorithm. *Ultrasonic Imaging*, **6**(1):81 – 94, 1984.
- [And02] P. D. Andrews, I. S. Harper, J. R. Swedlow. To 5d and beyond: Quantitative fluorescence microscopy in the postgenomic era. *Traffic*, **3**(1):29–36, 2002.

- [Arn07] C. L. Arnold. Erzeugung optischer Durchbrüche bei hoher numerischer Apertur: numerische Simulationen zur Submikrometer-Manipulation transparenter Materialien und biologischer Zellen mit ultrakurzen Laserpulsen. Fakultät für Mathematik und Physik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2007.
- [Ash05] N. W. Ashcroft, D. N. Mermin. Solid State Physics. Oldenbourg Verlag, 2. edition, 2005.
- [Bal08] A. Balevic, L. Rockstroh, A. Tausendfreund, S. Patzelt, G. Goch, S. Simon. Accelerating simulations of light scattering based on finite-difference time-domain method with general purpose GPUs. In Proc. 11th IEEE Int. Conf. Computational Science and Engineering CSE '08, pages 327–334. 2008.
- [Bea94] D. Beard, B. Hemminger, E. Pisano, K. Denelsbeck, D. Warshauer, M. Mauro, B. Keefe, W. McCartney, C. Wilcox. Computed tomography interpretations with a low-cost workstation: A timing study. *Journal of Digital Imaging*, **7**:133–139, 1994.
- [Bet06] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, **313**(5793):1642–1645, 2006.
- [Bir10] U. J. Birk, M. Rieckher, N. Konstantinides, A. Darrell, A. Sarasa-Renedo, H. Meyer, N. Tavernarakis, J. Ripoll. Correction for specimen movement and rotation errors for in-vivo optical projection tomography. *Biomed Opt Express*, **1**(1):87–96, 2010.
- [Bir11] U. J. Birk, A. Darrell, N. Konstantinides, A. Sarasa-Renedo, J. Ripoll. Improved reconstructions and generalized filtered back projection for optical projection tomography. *Appl Opt*, **50**(4):392–398, 2011.
- [Bor99] M. Born, E. Wolf. Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light. Cambridge University Press, 7th edition, 1999.
- [Boy76] G. R. Boyer. Pupil filters for moderate superresolution. *Appl Opt*, **15**(12):3089–3093, 1976.
- [Bro08] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol. Taschenbuch der Mathematik, m. CD-ROM. Harri Deutsch GmbH, 2008.
- [Brz08] O. Brzobohatý, T. Cizmár, P. Zemánek. High quality quasi-bessel beam generated by round-tip axicon. *Opt Express*, **16**(17):12688–12700, 2008.

-
- [Bur96] M. Burrows. *The Neurobiology of an Insect Brain*. Oxford University Press, 1996.
- [Bur07] W. Burger, M. J. Burge. *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction using Java*. Springer Science+Business Media, New York, 2007.
- [Buz08] T. M. Buzug. *Computed tomography from photon statistics to modern cone-beam CT*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008.
- [Cha94] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**(5148):802–805, 1994.
- [Con04] R. Connally, D. Veal, J. Piper. Flash lamp-excited time-resolved fluorescence microscope suppresses autofluorescence in water concentrates to deliver an 11-fold increase in signal-to-noise ratio. *J Biomed Opt*, **9**(4):725–34, 2004.
- [Dan11] H. Dana, S. Shoham. Numerical evaluation of temporal focusing characteristics in transparent and scattering media. *Opt Express*, **19**(6):4937–4948, 2011.
- [de 03] D. M. de Juana, J. E. Oti, V. F. Canales, M. P. Cagigal. Design of superresolving continuous phase filters. *Opt Lett*, **28**(8):607–609, 2003.
- [Deb07] D. Debarre, M. J. Booth, T. Wilson. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies. *Opt. Express*, **15**(13):8176–8190, 2007.
- [Dem99] W. Demtröder. *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. Springer Verlag, 1999.
- [Dem10] W. Demtröder. *Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4 edition, 2010.
- [Dod07] H. U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jährling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgänsberger, K. Becker. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods*, **4**(4):331–336, 2007.
- [Doy92] S. A. C. Doyle. *Adventures of Sherlock Holmes*. Harper & Brothers, 1892.
- [Drö98] A. Dröschner. Camillo golgi and the discovery of the golgi apparatus. *Histochemistry and Cell Biology*, **109**:425–430, 1998.

- [Duf06] P. Dufour, M. Piché, Y. D. Koninck, N. McCarthy. Two-photon excitation fluorescence microscopy with a high depth of field using an axicon. *Appl. Opt.*, **45**(36):9246–9252, 2006.
- [Dun99] R. C. Dunn. Near-field scanning optical microscopy. *Chemical Reviews*, **99**(10):2891–2928, 1999.
- [Dur87] J. Durnin, J. J. M. Jr, J. H. Eberly. Diffraction-free beams. *Physical Review Letters*, **58**(15):1499–1501, 1987.
- [Eic] R. Eickhoff, R.-A. Lorbeer, H. Scheiblich, A. Heisterkamp, H. Meyer, M. Stern, G. Bicker. Scanning laser optical tomography resolves structural plasticity during regeneration in an insect brain. Eingereicht.
- [Ein05] A. Einstein. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen der Physik*, **322**(6):132–148, 1905.
- [Fah10] F. O. Fahrbach, P. Simon, A. Rohrbach. Microscopy with self-reconstructing beams. *Nat Photon*, **4**:780–485, 2010.
- [Fer06b] E. J. Fernandez, L. Vabre, B. Hermann, A. Unterhuber, B. Povazay, W. Drexler. Adaptive optics with a magnetic deformable mirror: applications in the human eye. *Opt. Express*, **14**(20):8900–8917, 2006.
- [Fri00] N. Friedman, A. Kaplan, N. Davidson. Acousto-optic scanning system with very fast nonlinear scans. *Opt Lett*, **25**(24):1762–1764, 2000.
- [Fri08] J.-M. Fritschy. Is my antibody-staining specific? how to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci*, **28**(12):2365–2370, 2008.
- [GM31] M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, **401**(3):273–294, 1931.
- [Gri65] P. F. M. Grimaldo. Physico-mathesis de lvmine, coloribvs, et iride, aliisque adnexis libri duo. 1665.
- [Gu00] M. Gu. Advanced optical imaging theory. Springer, 2000.
- [Ham11] H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, **14**(11):1481–1488, 2011.
- [Han10] A. Hansen, M. K. Khattab, R.-A. Lorbeer, R. R. Krüger, H. Lubatschowski. Adaptive Optics for the Correction of Eye Aberrations.

-
- In Manns, F and Soderberg, PG and Arthur, HO, editor, OPHTHALMIC TECHNOLOGIES XX, volume 7550 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*. SPIE; Topcon Advanced Biomed Imaging Lab & Swedish Ophthalmol Soc, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. Conference on Ophthalmic Technologies XX, San Francisco, CA, JAN 23-25, 2010.
- [Har59] P. Harting. Das Mikroskop: Theorie, Gebrauch, Geschichte und gegenwärtiger Zustand desselben. Vieweg, 1859.
- [Hei05] A. Heisterkamp, I. Z. Maxwell, S. Kumar, J. M. Underwood, J. A. Nickerson, D. E. Ingber, E. Mazur. Nanosurgery in live cells using ultrashort laser pulses. *Proceedings of SPIE*, **5695**:230–235, 2005.
- [Hei11] M. Heidrich, M. P. Kühnel, M. Kellner, R.-A. Lorbeer, T. Lange, A. Winkel, M. Stiesch, H. Meyer, A. Heisterkamp. 3d imaging of biofilms on implants by detection of scattered light with a scanning laser optical tomograph. *Biomed. Opt. Express*, **2**(11):2982–2994, 2011.
- [Hel93] S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, E. H. K. Stelzer. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *Journal of Microscopy*, **169**(3):391–405, 1993.
- [Hel03] S. W. Hell. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology*, **21**(11):1347–1355, 2003.
- [Her02] J. Herbst, K. Heyne, R. Diller. Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization. *Science*, **297**(5582):822–825, 2002.
- [Hou73] G. N. Hounsfield. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. description of system. *Br J Radiol*, **46**(552):1016–1022, 1973.
- [Hui04] J. Huisken, J. Swoger, F. D. Bene, J. Wittbrodt, E. H. K. Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, **305**(5686):1007–1009, 2004.
- [Hui09] J. Huisken, D. Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, **136**(12):1963–1975, 2009.
- [Kac98] M. Kachelrieß. Reduktion von Metallartefakten in der Röntgen-Computer-Tomographie. Ph.D. thesis, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 1998.

- [Kak99] A. C. Kak, M. Slaney. Principles of Computerized Tomographic Imaging. IEEE PRESS, 1999.
- [Kal11] S. Kalies, K. Küttemeyer, A. Heisterkamp. Mechanisms of high-order photobleaching and its relationship to intracellular ablation. *Biomed Opt Express*, **2**(4):805–816, 2011.
- [Ke95] H. Ke, R. Chang. Ray-cast volume rendering accelerated by incremental trilinear interpolation and cell templates. *Visual Computer*, **11**(6):297–308, 1995.
- [Köh04] A. Köhler. Mikrographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für Mikroskopische Technik*, **21**:129–165, 1904.
- [Klo00] T. Klose, R. Leidl, I. Buchmann, H.-J. Brambs, S. N. Reske. Primary staging of lymphomas: cost-effectiveness of fdg-pet versus computed tomography. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **27**:1457–1464, 2000.
- [Kön00] K. König. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc*, **200**:83–104, 2000.
- [Koe12] S. Koenemann, T. Iliffe. Chapter accepted to be published 2012 in Treatise on Zoology, Vol. 5; new English edition of *Traité de Zoologie*; P.P. Grassé (ed.), Masson: Paris, Milan, Barcelone, chapter Class Remipedia. 2012.
- [Küt10] K. Küttemeyer, R. Rezgui, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp. Influence of laser parameters and staining on femtosecond laser-based intracellular nanosurgery. *Biomed Opt Express*, **1**(2):587–597, 2010.
- [Lak92] J. R. Lakowicz, H. Szmecinski, K. Nowaczyk, K. W. Berndt, M. Johnson. Fluorescence lifetime imaging. *Analytical Biochemistry*, **202**(2):316 – 330, 1992.
- [Lak06] J. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy. Number Bd. 1 in Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, 2006.
- [Leh99] T. M. Lehmann, C. Gonner, K. Spitzer. Survey: interpolation methods in medical image processing. **18**(11):1049–1075, 1999.
- [Leh01] T. M. Lehmann, C. Gonner, K. Spitzer. Addendum: B-spline interpolation in medical image processing. **20**(7):660–665, 2001.
- [Li05] J. Li, C. Papachristou, R. Shekhar. An fpga-based computing platform for real-time 3d medical imaging and its application to cone-beam ct reconstruction. *J. Imaging Science and Technology*, **49**:237–245, 2005.

-
- [Lia94] J. Liang, B. Grimm, S. Goelz, J. F. Bille. Objective measurement of wave aberrations of the human eye with use of a hartmann-shack wave-front sensor. *J. Opt. Soc. Am. A*, **11**(7):1949, 1994.
- [Liu05] H. Liu, Y. Yan, G. Jin. Design theories and performance limits of diffractive superresolution elements with the highest sidelobe suppressed. *J. Opt. Soc. Am. A*, **22**(5):828–838, 2005.
- [Lor08] A. Lorincz, Z. Nusser. Specificity of immunoreactions: the importance of testing specificity in each method. *J Neurosci*, **28**(37):9083–9086, 2008.
- [Lor09b] R.-A. Lorbeer, A. Heisterkamp. Three dimensional numerical simulation of complex optical systems using the coherent transfer function. In Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, volume 7367, page 73671K (7 pp.). SPIE - The International Society for Optical Engineering, USA, 2009. Advanced Microscopy Techniques, 14 June 2009, Munich, Germany.
- [Lor10a] R.-A. Lorbeer, H. Meyer, M. Heidrich, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp. Applying optical fourier filtering to standard optical projection tomography. In Conchello, JA and Cogswell, CJ and Wilson, T and Brown, TG, editor, THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: IMAGE ACQUISITION AND PROCESSING XVII, volume 7570 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*. SPIE, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. Conference on Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy - Image Acquisition and Processing XVII, San Francisco, CA, JAN 25-28, 2010.
- [Lor11a] M.-R. Lorbeer. Realisierung linearer und nichtlinearer Rekonstruktionsansätze auf der CUDA-Architektur zur Rekonstruktion optischer computertomographischer Daten. Master’s thesis, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 2011.
- [Lor11c] R.-A. Lorbeer, M. Heidrich, C. Lorbeer, D. F. R. Ojeda, G. Bicker, H. Meyer, A. Heisterkamp. Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph. *OPTICS EXPRESS*, **19**(6):5419–5430, 2011.
- [MA04] S. R. M.D. Abramoff, P. J. Magelhaes. Image processing with imagej. *Biophotonics International*, **11**(7):36–42, 2004.
- [Mah82] V. N. Mahajan. Strehl ratio for primary aberrations: some analytical results for circular and annular pupils. *J. Opt. Soc. Am.*, **72**(9):1258, 1982.

- [Mal93] T. Malzbender. Fourier Volume Rendering. *ACM Transactions on Graphics*, **12**(3):233–250, 1993.
- [Mat10] Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka. Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography. *Biomed. Opt. Express*, **1**(4):1209–1216, 2010.
- [Max65] J. C. Maxwell. A dynamical theory of the electromagnetic field. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **155**:459–512, 1865.
- [McG07] L. McGurk, H. Morrison, L. P. Keegan, J. Sharpe, M. A. O’Connell. Three-dimensional imaging of drosophila melanogaster. *PLoS One*, **2**(9):e834, 2007.
- [McG08] J. McGinty, K. B. Tahir, R. Laine, C. B. Talbot, C. Dunsby, M. A. A. Neil, L. Quintana, J. Swoger, J. Sharpe, P. M. W. French. Fluorescence lifetime optical projection tomography. *J Biophotonics*, **1**(5):390–394, 2008.
- [McG11] J. McGinty, H. B. Taylor, L. Chen, L. Bugeon, J. R. Lamb, M. J. Dallman, P. M. W. French. In vivo fluorescence lifetime optical projection tomography. *Biomed Opt Express*, **2**(5):1340–1350, 2011.
- [Mei99] E. H. W. Meijering, K. J. Zuiderveld, M. A. Viergever. Image reconstruction by convolution with symmetrical piecewise nth-order polynomial kernels. **8**(2):192–201, 1999.
- [Mer01] G. Merziger. Formeln + Hilfen zur höheren Mathematik. Binomi-Verlag, 2001.
- [Mer10] A. Mertins. Diskrete signale und systeme. In *Signaltheorie*, pages 70–110. Vieweg+Teubner, 2010.
- [Mie08] G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metal-lösungen. *Annalen der Physik*, **330**(3):377–445, 1908.
- [Nak90] O. Nakamura, S. Kawata. Three-dimensional transfer-function analysis of the tomographic capability of a confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, **7**(3):522–526, 1990.
- [Nol11] W. Nolting. Elektrodynamik. In *Grundkurs Theoretische Physik 3*, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2011.

-
- [Nut81] A. Nuttall. Some windows with very good sidelobe behavior. *IEEE Transactions on acoustics, speech, and signal processing*, **29**(1):84–91, 1981.
- [Ohm07] J.-R. Ohm, H. D. Lüke. *Determinierte Signale in linearen zeitinvarianten Systemen*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [Oro05] D. Oron, E. Tal, Y. Silberberg. Scanningless depth-resolved microscopy. *Opt Express*, **13**(5):1468–1476, 2005.
- [Paw06] J. B. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer Science+Business Media, New York, third edition, 2006.
- [Per73] B. J. Perry, C. Bridges. Computerized transverse axial scanning (tomography). 3. radiation dose considerations. *Br J Radiol*, **46**(552):1048–1051, 1973.
- [Pre92b] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, second edition edition, 1992.
- [Rad17] J. Radon. Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Mathematisch-Physische Klasse*, **69**:262–277, 1917.
- [Rie11] M. Rieckher, U. J. Birk, H. Meyer, J. Ripoll, N. Tavernarakis. Microscopic optical projection tomography in vivo. *PLoS One*, **6**(4):e18963, 2011.
- [Rön96a] W. C. Röntgen. Über eine neue Art von Strahlen II. Mittheilung. *Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft*, 1896.
- [Rön96b] W. C. Röntgen. Über eine neue Art von Strahlen (Vorläufige Mittheilung). *Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft*, 1896.
- [Rui08] D. Ruijters, B. M. ter Haar Romeny, P. Suetens. Efficient gpu-based texture interpolation using uniform b-splines. *journal of graphics, gpu, and game tools*, **13**(4):61–69, 2008.
- [Rus06] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, **3**(10):793–795, 2006.

- [Ryl06] C. G. Rylander, O. F. Stumpp, T. E. Milner, N. J. Kemp, J. M. Mendenhall, K. R. Diller, A. J. Welch. Dehydration mechanism of optical clearing in tissue. *J Biomed Opt*, **11**(4):041117, 2006.
- [Sal97b] T. R. M. Sales, G. M. Morris. Fundamental limits of optical superresolution. *Opt. Lett.*, **22**(9):582–584, 1997.
- [Sch00a] H. Schenk. Ein neuartiger mikromechanischer Aktor zur ein- und zweidimensionalen Ablenkung von Licht. Ph.D. thesis, Gerhard-Mercator-Universität-Gesamthochschule-Duisburg, 2000.
- [Sch00b] H. Schenk, P. Dürr, T. Haase, D. Kunze, U. Sobe, H. Lakner, H. Kück. Large deflection micromechanical scanning mirrors for linear scans and pattern generation. **6**(5):715–722, 2000.
- [Sch01] H. Schenk, P. Dürr, D. Kunze, H. Lakner, H. Kück. A resonantly excited 2d-micro-scanning-mirror with large deflection. *Sensors and Actuators A: Physical*, **89**:104 – 111, 2001.
- [Sch02] M. Schottner. Algorithms for the application of Hartmann-Shack wavefront sensors in ophthalmology. Ph.D. thesis, Heidelberg, Germany, 2002.
- [Sch04] M. Schwertner, M. Booth, T. Wilson. Simulation of specimen-induced aberrations for objects with spherical and cylindrical symmetry. *Journal of Microscopy-Oxford*, **215**(Part 3):271–280, 2004.
- [Sch07] H. Scherl, M. Koerner, H. G. Hofmann, W. Eckert, M. Kowarschik. Implementation of the fdk algorithm for cone-beam ct on the cell broadband engine architecture. *Proceedings of SPIE*, **6510**:651058–651058–10, 2007.
- [Sha02] J. Sharpe, U. Ahlgren, P. Perry, B. Hill, A. Ross, J. Hecksher-Sorensen, R. Baldock, D. Davidson. Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science*, **296**(5567):541–545, 2002.
- [Sha03b] J. Sharpe. Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy. *Journal of Anatomy*, **202**(2):175–181, 2003.
- [Sha04] J. Sharpe. Optical projection tomography. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **6**:209 – 228, 2004.
- [Spa11] W. Spalteholz. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten Nebst Anhang: Über Knochenfärbung. Leipzig Verlag von S. Hirzel, 1911.

-
- [Ste07] M. Stern, S. Knipp, G. Bicker. Embryonic differentiation of serotonin-containing neurons in the enteric nervous system of the locust (*Locusta migratoria*). *The Journal of Comparative Neurology*, **501**(1):38–51, 2007.
- [Tan01] Q. Tan, Y. Yan, G. Jin, M. Wu. Large aperture continuous phase diffractive optical element to realize uniform focal spot. *Optics and Lasers in Engineering*, **35**(3):165 – 175, 2001.
- [The09] The LyX Team. LyX 1.6.1 - The Document Processor [Computer software and manual]. Internet: <http://www.lyx.org>, 2009. Retrieved February 16, 2009, from <http://www.lyx.org>.
- [Tsa07] X. Tsampoula, V. Garces-Chavez, M. Comrie, D. J. Stevenson, B. Agate, C. T. A. Brown, F. Gunn-Moore, K. Dholakia. Femtosecond cellular transfection using a nondiffracting light beam. *Applied Physics Letters*, **91**(5):053902, 2007.
- [Tse09] S.-J. Tseng, Y.-H. Lee, Z.-H. Chen, H.-H. Lin, C.-Y. Lin, S.-C. Tang. Integration of optical clearing and optical sectioning microscopy for three-dimensional imaging of natural biomaterial scaffolds in thin sections. *J Biomed Opt*, **14**(4):044004, 2009.
- [Tuc07] V. V. Tuchin. A clear vision for laser diagnostics (review). **13**(6):1621–1628, 2007.
- [Vas05] G. Vasilescu. Physical noise sources. In *Electronic Noise and Interfering Signals, Signals and Communication Technology*, pages 45–68. Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [VDB83] C. Van Den Broeck. On the relation between white shot noise, gaussian white noise, and the dichotomic markov process. *Journal of Statistical Physics*, **31**:467–483, 1983. 10.1007/BF01019494.
- [Vin09] C. Vinegoni, L. Fexon, P. F. Feruglio, M. Pivovarov, J.-L. Figueiredo, M. Nahrendorf, A. Pozzo, A. Sbarbati, R. Weissleder. High throughput transmission optical projection tomography using low cost graphics processing unit. *Optics Express*, **17**(25):22320–22332, 2009.
- [Vol66] H. Volkman. Ernst abbe and his work. *Appl. Opt.*, **5**(11):1720–1731, 1966.
- [Wag10] M. Wagner, P. Weber, T. Bruns, W. S. L. Strauss, R. Wittig, H. Schneckenburger. Light dose is a limiting factor to maintain cell viability in fluorescence microscopy and single molecule detection. *Int J Mol Sci*, **11**(3):956–966, 2010.

- [Wal05] J. R. Walls, J. G. Sled, J. Sharpe, R. M. Henkelman. Correction of artefacts in optical projection tomography. *Physics in Medicine and Biology*, **50**:4645–4665, 2005.
- [Wal07] J. R. Walls, J. G. Sled, J. Sharpe, R. M. Henkelman. Resolution improvement in emission optical projection tomography. *Physics in Medicine and Biology*, **52**:2775–2790, 2007.
- [Wan02] R. K. Wang. Signal degradation by multiple scattering in optical coherence tomography of dense tissue: a monte carlo study towards optical clearing of biotissues. *Phys Med Biol*, **47**(13):2281–2299, 2002.
- [Wee63] J. L. Weeks, G. M. Meaburn, S. Gordon. Absorption coefficients of liquid water and aqueous solutions in the far ultraviolet. *Radiat Res*, **19**:559–567, 1963.
- [Wei00] S. Weiss. Shattering the diffraction limit of light: a revolution in fluorescence microscopy? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(16):8747–8749, 2000.
- [Why05] G. Whyte, J. Courtial. Experimental demonstration of holographic three-dimensional light shaping using a Gerchberg-Saxton algorithm. *New Journal of Physics*, **7**:117+, 2005.
- [Wil02] C. S. Williams, O. A. Becklund. Introduction to the optical transfer function. SPIE-International Society for Optical Engineering, 2002.
- [Xu07] F. Xu, K. Mueller. Real-time 3d computed tomographic reconstruction using commodity graphics hardware. *Phys Med Biol*, **52**(12):3405–3419, 2007.
- [Yag81] J. Yager. Remipedia, a new class of crustacea from a marine cave in the bahamas. *Journal of Crustacean Biology*, **1**(3):328–333, 1981.
- [Yee66] K. Yee. Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell’s equations in isotropic media. **14**(3):302–307, 1966.
- [You03] T. Young. Experiments and calculations relative to physical optics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **94**:1–16, 1803.
- [Zip03] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, **21**(11):1369–1377, 2003.

Symbole und Abkürzungen

Abkürzungen und Akronyme

APSF	Amplituden-Punktspreizfunktion
CT	Computertomographie
CTF	Kohärenztransferfunktion
cw	continuous wave
DFT	diskrete Fouriertransformation
FBP	filtered back projection
FFT	fast fourier transformation
FPGA	field programmable gate array
FSR	Fourierschnittrekonstruktion
FST	Fourierschnitttheorem
GFP	green fluorescent protein
GPU	graphics processing unit
IPSF	Intensitäts-Punktspreizfunktion
L1	erstes Larvenstadium
LSBM	light sheet based microscopy
LZH	Laser Zentrum Hannover
MTF	Modulationstransferfunktion
NA	Numerische Apertur
OPT	optical projection tomography (dt.:optische Projektionstomographie)
OTF	optische Transferfunktion
PMT	photomultiplier tube (dt.: Photoelektronenvervielfacher)

PSF	Punktspreizfunktion
PTF	Phasentransferfunktion
QE	Quanteneffizienz
S0	Singulettzustand 0
S1	Singulettzustand 1
SIRT	simultaneous iterative reconstruction technique
SLOT	scanning laser optical tomograph (dt.:scannender laseroptischer Tomograph)
SLOTy	scanning laser optical tomography (dt.: scannende laseroptische Tomographie)
SNR	signal-to-noise ratio (dt.: Signal-Rausch-Verhältnis)
STED	stimulated emission depletion
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
T1	Tripletzustand 1
USAF	United States Air Force
CLSM	confocal laser scanning microscopy (dt.:konfokale laserscannende Mikroskopie)
CUDA	compute unified device architecture
OCT	optical coherence tomography (dt.: optische Kohärenztomographie)
QE	Quanteneffizienz
w.E.	willkürliche Einheit
ZNS	Zentrales Nervensystem

Symbole

\acute{S}	Strehlverhältnis
$\check{f}(x, y)$	mit der Auswertungsoperation rekonstruierte Ebene
Δk_{Ewald}	Dicke der Ewaldkugelschale im Frequenzraum
$\Delta k_{N,M,O}$	Breite des Spektrums im Frequenzraum auf der x,y,z-Achse
$\Delta k_{x,y,z}$	Längenbereich der Wellenvektoren in x,y,z-Richtung

$\Delta r_{N,M,O}$	Breite des Ortsraumes in x,y,z-Richtung
$\Delta x, \Delta y, \Delta z$	Auflösung in x,y,z-Richtung
Δx_{Gitter}	Abstand zwischen zwei Stützstellen
$\delta(x)$	Dirac-Funktion
$\Delta\nu$	spektrale Breite
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
$\text{bspline}(s)$	kubische spline Interpolationsfunktion
$\text{fenster}(s)$	Fensterfunktion
FT	Fouriertransformation
$\text{lin}(s)$	lineare Interpolationsfunktion
$\text{NA}_{\text{Außen}}$	maximale NA bei einer Ringausleuchtung
NA_{Innen}	minimale NA bei einer Ringausleuchtung
$\text{near}(s)$	nächster-Nachbar-Funktion
RE_{max}	maximale Restempfindlichkeit
RT	Radontransformation
$\text{sinc}_{\text{Kernel}}(s)$	sinc-Interpolationsfunktion
μ	magnetische Permeabilität
$\mu_{\text{Bernoulli}}$	Erwartungswert der Bernoulliverteilung
μ_{Poisson}	Erwartungswert der Poissonverteilung
μ_A	Absorptionskoeffizient
μ_S	Streukoeffizient
ν	Frequenz
ω	Kreisfrequenz
ω_B	Bildfrequenz
ρ	elektrische Ladungsdichte
$\sigma_{\text{Bernoulli}}$	Standardabweichung der Bernoulliverteilung

σ_{Poisson}	Standardabweichung der Poissonverteilung
σ_{Streuung}	Streuquerschnitt
$\Pi(x)$	Rechteckfunktion
$\tau_{\text{Kohärenz}}$	Kohärenzzeit
Θ	Polarwinkel bei Kugelkoordinaten
θ	Winkel zwischen optischer Achse und einfallendem Lichtstrahl
Θ'	Verkipfungswinkel des einfallenden Strahls
ε	elektrische Permittivität
φ	Phase
\vec{D}	dielektrischen Verschiebungsdichte im Frequenzraum
\vec{E}	elektrischer Feldvektor im Frequenzraum
\vec{a}	Vektor mit N Komponenten
\vec{B}	magnetischer Feldvektor
\vec{D}	dielektrischen Verschiebungsdichte
\vec{E}	elektrischer Feldvektor
\vec{E}_{neu}	elektrischer Feldvektor nach Depolarisation
\vec{e}_{φ}	Normalvektor der Azimutwinkelkoordinate in Kugelkoordinaten
$\vec{e}_{x,y,z}$	Einheitsvektor der jeweiligen Achse
\vec{j}	elektrische Stromdichte
\vec{k}	Wellenvektor
\vec{n}	normierter Wellenvektor
\vec{r}	Ortsvektor
$\hat{k}_{x,y}$	x,y-Position in der hinteren Fokusebene
$\hat{P}(r)$	Dichtefunktion der hinteren Fokalebene
\hat{r}	auf eins normierter Radius in der hinteren Apertur
$\tilde{f}(x, y, q)$	Zwischenfunktion zur Herleitung der gefilterten Rückprojektion
$\tilde{R}(p, \varphi)$	gefilterte Radontransformierte

ξ	Skalierungsfaktor
A	Auswertungsoperation
A_{norm}	Normierungsfaktor
b	Bildabstand bei einer Abbildung
c	Lichtgeschwindigkeit
c'	Lichtgeschwindigkeit im Medium
d_M	Abstand zwischen den Hauptebenen zweier Linsen beim Mikroskop
D_{HFE}	Durchmesser der hinteren Fokalebene
f	Brennweite einer Linse
$g(\theta)$	Projektionsgleichung
H	Stützstellen des Interpolationskerns
h	Plancksches-Wirkungsquantum
$I(x)$	Intensität
j, k, l	Zählparameter der Stützstellen in x,y,z-Richtung
K	Kontrast
$k'_{\text{Fokalebene}}$	Radius der hinteren Fokalebene
k_{Ewald}	Radius der Ewaldkugel
m	Anzahl der Zielwerte des Simulationsvolumens
n	Brechungsindex
N, M, O	Anzahl der Stützstellen in x,y,z-Richtung
o	Anzahl der Stützstellen der CTF
p	Abstand zum Ursprung
$P(\theta)$	Dichtefunktion des fokussierten Lichtkegels
p^*	Erfolgswahrscheinlichkeit
Q	Anzahl der Photonen
q	Abstand zur Zielkoordinate (Integrationsparameter für Herleitung)
r	Radius der Polarkoordinaten in der hinteren Fokalebene

$R(p, \varphi)$	Radontransformierte
s	Abstand normiert auf den Stützstellenabstand
$S(x)$	Signal
s_0	minimaler Sichtabstand des Auges
$\text{sinc}(x)$	Sinc-Funktion
t	Zeit
$T_{jkl}(\vec{k})$	Abtastfunktion
V_M	Vergrößerung eines Mikroskops
V_L	Vergrößerung einer Linse bzw. Lupe
$W(x)$	Wert an der Stelle x
x, y, z	Koordinaten des euklidischen Raums
Z_j^i	Zernikesummand

A. Nebenrechnungen zur inversen Radontransformation

Ausführliche Berechnungen zu Abschnitt 5.2.2:

Zunächst kann $f(x, y)$ in zwei Terme gespalten werden:

$$\begin{aligned} f(x, y) &= -\frac{1}{\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) \\ &= -\frac{1}{2\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) - \frac{1}{2\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) \end{aligned}$$

Durch Substitution können die Integrationsgrenzen negiert werden.

$$f(x, y) = -\frac{1}{2\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) - \frac{1}{2\pi} \left(\int_0^{-\infty} -dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, -q)}{-q} \right)$$

Für die Ableitungen von $\tilde{f}(x, y, -q)$ gilt nach Kettenregel:

$$\partial_q \tilde{f}(x, y, -q) = -\partial_q \tilde{f}(x, y, q)$$

Zusätzlich ändert das Vertauschen der Integrationsgrenzen das Vorzeichen, wodurch der zweite Term bis auf die Integrationsgrenzen dem ersten Term entspricht.

$$\begin{aligned} f(x, y) &= -\frac{1}{2\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) + \frac{1}{2\pi} \left(\int_0^{-\infty} dq \frac{-\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{-q} \right) \\ &= -\frac{1}{2\pi} \left(\int_0^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) - \frac{1}{2\pi} \left(\int_{-\infty}^0 dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right) \end{aligned}$$

Die Summe beider Terme ist die gesuchte Gleichheit:

$$f(x, y) = -\frac{1}{2\pi} \left(\int_{-\infty}^\infty dq \frac{\partial_q \tilde{f}(x, y, q)}{q} \right)$$

B. Empfindlichkeit bei isotroper Emission

Für eine isotrope Emission kann die Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der NA durch den erfassten Anteil einer auf eins normierten Kugeloberfläche berechnet werden [Lor11c]:

$$\begin{aligned} \text{Empfindlichkeit} \left(\frac{\text{NA}}{n} \right) &= \frac{1}{4\pi} \int_0^{\arcsin(\frac{\text{NA}}{n})} d\varphi 2\pi \sin(\varphi) \\ &= -\frac{1}{2} [\cos(\varphi)]_0^{\arcsin(\frac{\text{NA}}{n})} = \frac{1}{2} \left[1 - \cos(\arcsin(\frac{\text{NA}}{n})) \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA}}{n} \right)^2} \right] \approx \frac{(\text{NA}/n)^2}{4} \end{aligned}$$

Die erste Gleichung setzt sich aus einem Integral für die Teilkugeloberfläche einer Optik mit einem Öffnungswinkel von $\arcsin(\frac{\text{NA}}{n})$ und dem Normierungsfaktor $\frac{1}{4\pi}$ zusammen. Auf diese Weise liegt das Ergebnis zwischen 0 und $\frac{1}{2}$ ($\hat{=}$ 50%). Die Näherung gilt für kleine NA, da hier der maximale Wert bei $\frac{1}{4}$ ($\hat{=}$ 25%) liegt.

C. 1951 USAF Auflösungsstandard

Der Auflösungsstandard besteht aus einer Ansammlung von Linientriplets, die in einer Größe zum einen horizontal und zum Anderen vertikal aufgetragen sind. Diese Paare sind in verschiedenen Größen dargestellt, die in Gruppen unterteilt wurden. Die Größe ist in lp/mm (Linienpaare pro Millimeter) angegeben. Die Unterteilung laut Herstellerangaben (Edmund Optics) lautet:

Gruppen Nummer

Element	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1,00	2,00	4,00	8,00	16,00	32,00	64,00	128,00	256,00	512,00
2	1,12	2,24	4,49	8,98	17,96	35,92	71,84	143,68	287,35	574,70
3	1,26	2,52	5,04	10,08	20,16	40,32	80,64	161,27	322,54	645,08
4	1,41	2,83	5,66	11,32	22,63	45,25	90,51	181,02	362,04	
5	1,59	3,17	6,35	12,70	25,40	50,80	101,59	203,19	406,37	
6	1,78	3,56	7,13	14,25	28,51	57,02	114,04	228,07	456,14	

D. ImageJ-Makro zur SNR-Bestimmung

```
1 //This macro needs a stack as input information
2 //first the average of 500 segments in the horizontal middle of each image is taken
  . The size of the segments is defined by a previous selection.
3 //Then all results from each slice are averaged for each segment.
4 //Afterwards, the difference of two consecutive images is taken. Now the variance
  of each segment is taken and then averaged over all slices.
5 //The results are printed pairwise in the results window.
6
7 run("32-bit");
8 height = getHeight();
9 halfwidth = getWidth()/2;
10 run("Clear Results");
11 setBatchMode(true);
12 getSelectionBounds(halfwidth, y, swidth, sheight); //swidth can be chosen to e.g.
  5 px and sheight should be chosen to 1 px
13 makeRectangle(0, 0, swidth, sheight); //set segment
14
15 for (y=1; y<height ; y++)
16 {
17     setSelectionLocation(halfwidth , y); //move to next segment
18     n = nSlices;
19     meanstd = 0;
20     meanval = 0;
21
22     for (i=1; i<n; i++)
23     { //get average mean for current
24         segment
25         setSlice(i);
26         getStatistics(area, mean, min, max, std);
27         meanval += mean;
28     }
29     setResult("mean", y-1, meanval/n); //save result
30 }
31
32 updateResults();
33 makeRectangle(0, 0, getHeight(), getWidth()); //select all
34 setPasteMode("Subtract"); //set to subtract paste mode
35 run("Set Slice ...", "slice="+nSlices);
36 run("Select All");
37
38 for(i=1; i<nSlices; i++)
39 { //calculate difference between
40     two consecutive images
41     run("Previous Slice [<]");
42     run("Copy");
43     run("Next Slice [>]");
44     run("Paste");
45     run("Previous Slice [<]");
46 }
47 makeRectangle(0, 0, swidth, sheight); //set segment
48
```

```
49     for (y=1; y<height ; y++)
50     {
51
52         setSelectionLocation(halfwidth , y);           //move to next segment
53         n = nSlices;
54         meanstd = 0;
55         meanval = 0;
56
57         for (i=1; i<n; i++)
58         {                                           //get average standard deviation
59             for current segment
60             setSlice(i);
61             getStatistics(area , mean, min, max, std);
62             meanstd += std;
63         }
64         setResult("std", y-1, meanstd/n);           //save result
65     }
66
67     updateResults();
```

E. Empfindlichkeit mit superpositioniertem Hintergrundsignal

Ist auf der eigentlichen Messung mit einem optischen System eine zusätzliche Hintergrundquelle, die ein Schrotrauschverhalten (Poissonverteilung) aufweist, kann über ein neues SNR_{neu} die neue Empfindlichkeit abgeleitet werden. Hierfür wird die Beziehung zwischen der effektiven Intensität \hat{I} und dem zugehörigen SNR genutzt:

$$\text{Empfindlichkeit}_{neu} = \frac{\hat{I}_{neu}}{\hat{I}_{alt}} \text{Empfindlichkeit}_{alt} = \frac{SNR_{neu}^2}{SNR_1^2} \text{Empfindlichkeit}_{alt}$$

Somit muss lediglich SNR_{neu}^2 bestimmt werden. Dieses setzt sich aus dem ursprünglichen Signal μ_1 und dem vermischten Rauschen $\sigma_{neu} = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$ beider Quellen σ_1 und σ_2 zusammen:

$$SNR_{neu} = \frac{\mu_{neu}}{\sigma_{neu}} = \frac{\mu_1}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

$$SNR_{neu}^2 = \frac{\mu_1^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$$

Da bei Poissonverteilten Rauschquellen das SNR proportional zum Rauschen ist, folgt:

$$SNR_{neu}^2 = \frac{\mu_1^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2} = \frac{SNR_1^4}{SNR_1^2 + SNR_2^2}$$

und für die neue Empfindlichkeit folgt:

$$\text{Empfindlichkeit}_{neu} = \frac{SNR_{neu}^2}{SNR_1^2} * \text{Empfindlichkeit}_{alt} = \frac{SNR_1^2}{SNR_1^2 + SNR_2^2} * \text{Empfindlichkeit}_{alt}$$

Eingesetzte Software

Diese Arbeit wurde mit LyX 2.0.0 [The09] verfasst. Grafiken wurden mit Inkscape 0.48 erstellt und Rohdaten mit ImageJ 1.46b [MA04, Bur07] bearbeitet und ausgewertet. Als Plotprogramme kamen SciDAVis 0.2.4 und Origin Lab 8.5G zum Einsatz. Die Entwicklung der Simulations- und Rekonstruktionssoftware fand in der Microsoft Visula Studio 2008 Umgebung statt. Für die Umsetzung der FFT wurde das FFTW 3.3 und das cuFFT 4.0 Paket eingesetzt. Das Titelbild wurde mit Voreen 2.6.1 und GIMP 2.6.10 erstellt.

Publikationsliste

Journal Artikel

Veröffentlicht

1. M. Heidrich, M. P. Kühnel, M. Kellner, **R.-A. Lorbeer**, T. Lange, A. Winkel, M. Stiesch, H. Meyer, A. Heisterkamp. 3d imaging of biofilms on implants by detection of scattered light with a scanning laser optical tomograph. *Biomed. Opt. Express*, **2**(11):2982–2994, 2011.
2. **R.-A. Lorbeer**, M. Heidrich, C. Lorbeer, D. F. R. Ojeda, G. Bicker, H. Meyer, A. Heisterkamp. Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph. *OPTICS EXPRESS*, **19**(6):5419–5430, 2011.
3. S. Steinlechner, S. Barke, J. Dück, L. Hoppe, **R.-A. Lorbeer**, M. Otto, A. Sambrowski, T. Westphal. Der Lifter - Ein Flugobjekt mit Ionenantrieb -. *PhyDid A - Physik und Didaktik in Schule und Hochschule*, **2**(7):20–26, 2008.

Eingereicht

1. R. Eickhoff, **R.-A. Lorbeer**, H. Scheiblich, A. Heisterkamp, H. Meyer, M. Stern, G. Bicker. Scanning laser optical tomography resolves structural plasticity during regeneration in an insect brain. Eingereicht.
2. M. Kellner, M. Heidrich, R. Beigel, **R.-A. Lorbeer**, L. Knudsen, T. Ripken, A. Heisterkamp, H. Meyer, M. P. Kühnel, M. Ochs. Imaging of the mouse lung with scanning laser optical tomography (slot). Im Reviewprozess.

Proceedings Artikel

1. **R.-A. Lorbeer**, H. Meyer, M. Heidrich, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp. Applying optical fourier filtering to standard optical projection tomography. In Conchello, JA and Cogswell, CJ and Wilson, T and Brown, TG, editor, THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: IMAGE ACQUISITION AND PROCESSING XVII, volume 7570 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*. SPIE, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. Conference on Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy - Image Acquisition and Processing XVII, San Francisco, CA, JAN 25-28, 2010.

2. W. A. Ertmer, H. Meyer, **R.-A. Lorbeer**, G. Bergmann, C. Kraemer, H. Lubatschowski, H. M. Escoboar, I. Nolte, A. Heisterkamp. Optical forces in biophotonics: transfection and cell sorting. In Galvez, EJ and Andrews, DL and Gluckstad, J, editor, COMPLEX LIGHT AND OPTICAL FORCES IV, volume 7613 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*. SPIE, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. Conference on Complex Light and Optical Forces IV, San Francisco, CA, JAN 27-28, 2010.
3. A. Krüger, M. Hovakimyan, D. F. Ramirez, **R.-A. Lorbeer**, M. Kroeger, O. Stachs, A. Wree, R. F. Guthoff, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp. Three-dimensional multimodal microscopy of rabbit cornea after cross-linking treatment. In Manns, F and Soderberg, PG and Arthur, HO, editor, OPHTHALMIC TECHNOLOGIES XX, volume 7550 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*. SPIE; Topcon Advanced Biomed Imaging Lab & Swedish Ophthalmol Soc, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. Conference on Ophthalmic Technologies XX, San Francisco, CA, JAN 23-25, 2010.
4. A. Hansen, M. K. Khattab, **R.-A. Lorbeer**, R. R. Krüger, H. Lubatschowski. Adaptive Optics for the Correction of Eye Aberrations. In Manns, F and Soderberg, PG and Arthur, HO, editor, OPHTHALMIC TECHNOLOGIES XX, volume 7550 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*. SPIE; Topcon Advanced Biomed Imaging Lab & Swedish Ophthalmol Soc, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. Conference on Ophthalmic Technologies XX, San Francisco, CA, JAN 23-25, 2010.
5. **R.-A. Lorbeer**, A. Heisterkamp. Three dimensional numerical simulation of complex optical systems using the coherent transfer function. In *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, volume 7367, page 73671K (7 pp.). SPIE - The International Society for Optical Engineering, USA, 2009. Advanced Microscopy Techniques, 14 June 2009, Munich, Germany.

Konferenzbeiträge

1. Poster: **R.-A. Lorbeer**, M. Heidrich, R. Eickhoff, M. Stern, S. Koenemann, G. Bicker, H. Meyer, A. Heisterkamp. Scattering as a contrast agent in optical projection tomography. *Focus on Microscopy (FOM) in Konstanz*, 2011.
2. Vortrag: **R.-A. Lorbeer**, H. Meyer, M. Heidrich, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp. Applying optical fourierfiltering to standard optical projection tomography. *7 Photonics West in San Francisco*, 2010.

3. Poster: **R.-A. Lorbeer**, A. Heisterkamp. Three dimensional numerical simulation of complex optical systems using the coherent transfer function. *European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) in München*, 2009.

Patente

Zugelassen

1. A. Heisterkamp, D. Rath, H. Meyer, **R.-A. Lorbeer**. Vorrichtung und verfahren zur selektion von partikeln. *Europäische Patentanmeldung*, **EP:2267430**, 2009.

Eingereicht

1. M. Heidrich, A. Heisterkamp, H. Meyer, **R.-A. Lorbeer**. Technik zur tomographischen bilderfassung. Eingereicht - Prioritätsdatum 17.12.2010 - DE102010063412.3-54.

Lebenslauf und Bildungsweg

Persönliche Daten

Name: Raoul-Amadeus Lorbeer
Geburtsdatum: 1. Februar 1984
Geburtsort: Crailsheim, Baden-Württemberg
Eltern: Dr. Peter Lorbeer
Marianne Lorbeer geb. Lurk
Familienstand: verheiratet - ein Kind

Ausbildung

Schulbildung: 07/2003 Abitur am Hermann - Billung -
Gymnasium Celle
Auslandsaufenthalt: 09/2000 - 05/2001 (11-te Klasse) Ontario Christian High
School (CA – USA)
Hochschulstudium: 10/2003 - 06/2008 Physikstudium an der Gottfried Wilhelm
Leibniz Universität Hannover - Abschluss
als Diplomphysiker
04/2004 - 03/2006 Studiengangszweithörer an der
Fernuniversität Hagen Fach:
Betriebswirtschaftslehre
07/2008 - Promotionsstudium Physik an der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
Hannover
Promotion: 07/2008 - Am Laser Zentrum Hannover e.V.

Beruflicher Werdegang

- 10/2005 - 02/2007 Wissenschaftliche Hilfskraft am Max Planck Institut für
04/2007 - 12/2007 Gravitationsphysik an der Leibniz Universität Hannover –
Betreuung und Entwicklung von Demonstrationsexperimenten
für Experimentalphysikalische Vorlesungen.
- 08/2006 - 12/2006 Institut für Quantenoptik an der Leibniz Universität
10/2007 - 02/2008 Hannover. - Entwicklung physikalischer Experimente für das
physikalische Anfängerpraktikum sowie der Betreuung der
Experimente für Experimentalphysikalische Vorlesungen.
- 07/2008 - Anstellung am Laser Zentrum Hannover e.V. als
wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen einer
Promotionsstelle.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei allen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben oder mich dabei unterstützt haben. Vorweg bei Prof. Dr. Alexander Heisterkamp, meinem Doktorvater, der mir den Freiraum und die Mittel zugestanden hat, um so ein breit gefächertes Gebiet überhaupt bearbeiten zu können. Neben der Unterstützung bei der Forschung möchte ich mich auch bei ihm und dem Korreferenten Prof. Dr. Uwe Morgner bedanken, dass sie sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit sorgfältig zu begutachten.

Während der gesamten Arbeit hatten meine Kollegen stets ein offenes Ohr für Fragen und anregende Diskussionen, die viel zu dem erfolgreichen Verlauf beigetragen haben. Einige Kollegen spielten hierbei eine besondere Rolle. Zu Beginn war dies hauptsächlich Cord Arnold, der mir viel über die Grundlagen der Optiksimation vermitteln konnte. Später konnte ich von Alexander Krüger einiges über die konfokale Mikroskopie und optische Kohärenztomographie erfahren um dann schließlich von Heiko Meyer in die „Geheimnisse“ der optischen Projektionstomographie (OPT) eingeweiht zu werden. Während dieser Zeit kam noch ein weiterer Doktorand, Marko Heidrich, hinzu mit dem Heiko und ich zusammen letztendlich viele Veränderungen an der OPT durchführten, was für sich genommen eine sehr spannende Zeit war und ist.

Ich will mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und das Verständnis während dieses Zeitraums von mittlerweile gut drei Jahren bedanken. Meine Frau Christina, die nicht nur Geduld mir gegenüber aufgebracht hat. Sie hat auch hervorragende Proben für unsere Veröffentlichung präpariert. Meine Brüder Lars, Jan und Marc, die mit mir nicht nur über Ideen gesponnen haben. Marc nahm mir mit seiner Masterarbeit einen ungeheuren Berg an Arbeit ab, der notwendig war, um die neue Rekonstruktionsidee weiter zu verfolgen. Meine Eltern Marianne und Peter waren stets Interessiert an meinem Projekt und haben neben anderen, die ich hier an andere Stelle bereits genannt habe, diese ganze Arbeit korrekturgelesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei den mitwirkenden Kooperationspartnern der AG von Prof. Dr. Gerd Bicker und deren auch eng befreundete Kollegen um Prof. Dr. Stefan Koenemann für die gute und auch erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

